



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANGELA CRISTINA DOS SANTOS FORSTNER

ANATOMIA FLORAL DO GÊNERO *BARBOSELLA* SCHLTR. (ORCHIDACEAE:  
PLEUROTHALLIDINAE)

CURITIBA

2020

ANGELA CRISTINA DOS SANTOS FORSTNER

ANATOMIA FLORAL DO GÊNERO *BARBOSELLA* SCHLTR. (ORCHIDACEAE:  
PLEUROTHALLIDINAE)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Botânica,  
Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná,  
como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Botânica,  
no

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Érika Amano.

Coorientador: Prof. Dr. Eric de Camargo Smidt.

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Rosilei Vilas Boas – CRB/9-939).

Forstner, Angela Cristina dos Santos.  
Anatomia floral do gênero *Barbosella* Schltr. (Orchidaceae:  
Pleurothallidinae). / Angela Cristina dos Santos Forstner. – Curitiba, 2020.  
48 f. : il.

Orientadora: Érika Amano.  
Coorientador: Eric de Camargo Smidt.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor de  
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Botânica.

1. Monocotiledônea. 2. Plantas. 3. Proteínas. 4. Orquídea. I. Título. II.  
Amano, Érika. III. Smidt, Eric de Camargo. IV. Universidade Federal do  
Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em  
Botânica.

CDD (20.ed.) 584.15



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BOTÂNICA -  
40001016004P9

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BOTÂNICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ANGELA CRISTINA DOS SANTOS FORSTNER** intitulada: **Anatomia floral do gênero *Barbosella* Schltr. (Orchidaceae: Pleurothallidinae)**, sob orientação da Profa. Dra. ERIKA AMANO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 28 de Maio de 2020.

Assinatura Eletrônica

31/05/2020 12:28:10.0

ERIKA AMANO

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

29/05/2020 16:14:53.0

VIVIANE DA SILVA PEREIRA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

29/05/2020 15:53:08.0

CLEUSA BONA

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

---

CENTRO POLITECNICO - Curitiba - Paraná - Brasil

CEP 81531980 - Tel: (41) 3361-1625 - E-mail: [pgbotanica.ufpr@gmail.com](mailto:pgbotanica.ufpr@gmail.com)

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 42397

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 42397



## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, pela força, pela esperança.

À minha família por acreditar na minha capacidade e sempre incentivar a seguir meus sonhos.

À minha orientadora Érika Amano e meu coorientador Eric Smidt por me mostrarem que sou mais resiliente do que pensei. Obrigada pelos conhecimentos adquiridos.

À Mônica Bolson por ter compartilhado comigo esse pequeno mundo mágico das *Barbosella*.

À toda equipe do Centro de Microscopia Eletrônica da UFPR e o *Taxonline* por proporcionarem condições de análise das amostras.

Ao Marcos Klingelfus pelas conversas sobre orquídeas e compartilhamento de parte dos materiais.

Ao técnico de Laboratório Nilson. Obrigada pelas conversas nas horas de cortes sem fim no micrótomo, os conselhos e a amizade sincera.

À professora e amiga Joseane Rachid pôr no ensino médio ter plantado em mim a semente pelo amor à biologia.

A todos os meus amigos e colegas do Programa de Pós-Graduação em Botânica da UFPR. Sou grata pelas risadas, cafés e pipocas sempre com muitas palavras de incentivo. A amizade de vocês foi o que mais me deu força para jamais desistir.

À Joana Corbellini, pelas caronas, gordices no shopping, risadas, abraços, conselhos. Sem dúvida, nossa amizade foi uma luz em muitos momentos.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Botânica Estrutural, em especial ao José e a Sthay. Vocês fizeram muita diferença para mim ao longo desses dois anos. Obrigada pelas risadas, conversas e palavras de incentivo.

Aos meus amigos da época de cursinho Diego, Nate e Jaque. Tenho muita sorte em tê-los na minha vida. Obrigada por todos os momentos de risadas, choros e apoio sempre incondicional.

À minha amiga do ensino médio Bia. Vimos o quanto cada uma cresceu e mudou ao longo desses anos, cada uma sempre (mesmo que longe) torcendo pelo sucesso da outra.

À gangue da graduação, em especial a Thays, Maíra, Ingrid, Matheus, Fabi, Manu, Ray, Steh. Vocês são meus presentinhos da graduação. Só tenho a agradecer por todos os momentos que vocês surtaram comigo e me deram forças.

Ao Leandro, pela amizade, apoio, risadas e parceria nos eventos do Pokémon Go.

À Niantic, Inc. desenvolvedora do jogo Pokémon Go que foi meu escape nesse último ano de mestrado.

Ao Marcos Henrique, por me ajudar com as correções do português e me ver/ler reclamar durante horas e no final dizer: “você consegue, tá acabando”.

A todos os meus alunos e ex-alunos, por me fazerem rir nos piores momentos. Por cada abraço e sorriso que foram minha motivação para dar sempre meu melhor. Tenho muito orgulho de vocês.

A todas as pessoas que tiveram participação direta ou indireta da minha formação como bióloga, professora e agora mestre.

*“Toda pessoa deveria ser aplaudida de pé pelo menos uma vez na vida,  
porque todos nós vencemos o mundo.”*

Extraordinário, R.J. Palácio.

## RESUMO

As orquídeas podem atrair seus polinizadores através de sinais visuais e olfatórios, sem de fato oferecer algum tipo de recompensa, caracterizando esse mecanismo como polinização por engodo. Outras orquídeas podem apresentar osmóforos e nectários, como estruturas secretoras relacionadas com o processo de polinização. O gênero *Barbosella*, um pequeno gênero dentro da subtribo Pleurothallidinae, possui 20 espécies, das quais nove ocorrem no Brasil e oito são endêmicas da Mata Atlântica. Nesse trabalho investigamos a presença de estruturas secretoras relacionadas com o mecanismo de atração e possíveis recompensas de nove espécies do gênero *Barbosella*, sendo oito ocorrentes no território brasileiro. Para isso, realizamos testes histoquímicos em flores frescas e analisamos o material em microscopia de luz e eletrônica de varredura. As espécies possuem características compatíveis com a miofilia, como a redução das peças florais e liberação de odores, características descritas em outras espécies dentro da subtribo Pleurothallidinae. Os osmóforos estão localizados nas sépalas, pétalas e labelos de distribuição variada, sendo caracterizados por papilas, tricomas ou células não papilosas. As espécies possuem um canal com células secretoras, e através dos testes histoquímicos, constatamos a presença de pequenas quantidades de proteínas nessa região em todas as espécies, exceto em *B. cucullata*, *B. crassifolia* e *B. miersii*. Concluímos que as espécies analisadas apresentam um sistema enganoso que envolve cor, ornamentação do labelo, liberação de odores e as pequenas quantidades de proteínas oferecidas que incentivam a visita e permanência dos polinizadores nas flores, aumentando as chances de sucesso reprodutivo.

Palavras-chave: Engodo. Miófilas. Monocotiledôneas. Osmóforos. Proteínas.



## ABSTRACT

Orchids can attract their pollinators through visual and olfactory signs, without actually offering any type of reward, characterizing this mechanism as deceit pollination. Other orchids may have osmophores and nectaries, as secretory structures related to the pollination process. The genus *Barbosella* a small genus within the subtribe Pleurothallidinae, has 20 species, of which nine occur in Brazil and eight are endemic to the Atlantic Forest. In this work, we investigated the presence of secretory structures related to the attraction mechanism and possible rewards of nine species of the genus *Barbosella*, which eight occurred in Brazilian territory. For that, we performed histochemical tests on fresh flowers and analyzed the material in light microscopy and scanning electron. The species have characteristics compatible with myophily, such as the reduction of floral parts and the release of odors, characteristics described in other species within the subtribe Pleurothallidinae. Osmophores are located on sepals, petals and lips of varying distribution, being characterized by papillae, trichomes or non-papillose cells. The species have a channel with secretory cells, and through histochemical tests, we found the presence of small amounts of proteins in this region in all species, except for *B. cucullata*, *B. crassifolia* and *B. miersii*. We conclude that the analyzed species have a deceptive system that involves color, lip ornamentation, odor release and the small amounts of proteins offered that encourage the visit and permanence of pollinators in the flowers, increasing the chances of reproductive success.

Key-words: Deceit. Myophily. Monocots. Osmophores. Protein.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>10</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>15</b>
CAPÍTULO I: Estudo comparativo em flores do gênero <i>Barbosella</i> Schltr. (Orchidaceae: Pleurothallidinae): evidência de polinização por engodo?	
Resumo.....	20
Introdução.....	20
Material e Métodos.....	23
Resultados.....	24
Micromorfologia.....	25
Testes histoquímicos.....	26
Anatomia.....	27
Discussão.....	29
Referências Bibliográficas.....	32
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>47</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

Orchidaceae Juss. é uma das maiores famílias de angiospermas (DRESSLER, 1990; 1993; PRIDGEON, 2014; CHASE et al., 2015), com aproximadamente 25.000 espécies agrupadas em 880 gêneros (GIVNISH et al., 2015). Com distribuição cosmopolita, são encontradas em praticamente todos os tipos de biomas, exceto nos desertos, embora algumas orquídeas ocorram em ambientes árido ou semidesérticos (PRIDGEON, 2014). A família é dividida em cinco subfamílias (CHASE et al., 2015), dentre elas Epidendroideae Lindl. que é a mais representativa com aproximadamente 21.000 espécies, o que abrange de 76 a 80% do número total de espécies da família Orchidaceae (FREUDENSTEIN e CHASE, 2015; GIVNISH et al., 2015).

A subtribo Pleurothallidinae Lindl. (Epidendroideae, Epidendrea) compreende aproximadamente 5.100 espécies distribuídas em 44 gêneros (KARREMANS, 2016). Possui distribuição neotropical, sendo as regiões dos Andes da Colômbia, Equador e Peru as mais ricas em espécies (PRIDGEON, 2005). É um grupo diverso composto por plantas terrestres, litófitas ou epífitas, de crescimento simpodial, ausência de pseudobulbo, frequentemente com ânulo em torno do ponto de inserção da inflorescência (PRIDGEON, 2005). As espécies da subtribo eram caracterizadas pela presença de uma articulação entre o ovário e o pedicelo (LUER, 1986), porém, estudos moleculares recentes adicionaram um pequeno clado da América Central (*Dilomilis*, *Tomzanonia* e *Neocogniauxia*) que não possuem essa característica (PRIDGEON e CHASE, 2001).

De acordo com um copilado dos estudos moleculares realizados para a subtribo, Karremans (2016) agrupou os gêneros em nove grupos de afinidade, dentre eles a afinidade *Restrepia* (Re), com aproximadamente 154 espécies distribuídas em oito gêneros, sendo eles: *Chamelophyton* Garay, *Dresslerella* Luer, *Echinosepala* Pridgeon & M.W.Chase, *Myoxanthus* Poepp. & Endl., *Pleurothallopsis* Port & Brade, *Restrepia* Kunth e *Restrepiella* Garay & Dunst e *Barbosella* Schlechter.

### GÊNERO *BARBOSELLA* SCHLTR.

O gênero *Barbosella* Schltr (Pleurothallidinae) é monofilético com distribuição disjunta na Mata Atlântica e nos Andes (PRIDGEON, 2005). Possui 20 espécies das quais nove ocorrem

no Brasil e oito são endêmicas da Mata Atlântica (BOLSON e SMIDT, 2019). São plantas geralmente epífitas, de pequeno a médio porte e inflorescência com uma única flor (LUER, 1986, 2000; PRIDGEON, 2005). As flores são pequenas, com sépalas e pétalas de coloração amarelas e castanhas e o labelo pode conter manchas, projeções e/ou canais, características típicas de plantas polinizadas por moscas (miofilas) (VAN DER PIJL e DODSON, 1966; LUER, 1986, 2000). As espécies também são caracterizadas pela articulação “*ball-and-socket*”, onde a base côncava do labelo é articulada com o pé bulboso da coluna (LUER, 1986, 2000).

A primeira revisão taxonômica para o gênero utilizando dados morfológicos foi proposta por Luer (2000), no qual 18 espécies foram reconhecidas através das similaridades entre a articulação do labelo e o pé da coluna. Devido a diferença nessa articulação, Luer (1986) considerou *Barbosella miersii* um gênero monoespecífico denominado *Barbrodria* Luer. Posteriormente, com estudos moleculares, Pridgeon e Chase (2001), incluiu *Barbrodria miersii* no gênero *Barbosella*. A última espécie descrita para o gênero foi *B. portillae* Luer (LUER, 2002), com ocorrência apenas no Equador, totalizando as 20 espécies no gênero.

Trabalhos anatômicos considerando algumas espécies de *Barbosella*, foram realizados por Pridgeon (1982a), que investigou as possíveis relações filogenéticas entre os gêneros da subtribo Pleurothallidinae através de um levantamento de caracteres vegetativos e florais, e que podem ser utilizados como caracteres diagnósticos da subtribo (PRIDGEON, 1982b). Entretanto, trabalhos buscando investigar a presença de estruturas secretoras nas peças florais das espécies do gênero *Barbosella* ainda precisam ser realizados.

## ESTRUTURAS SECRETORAS

Estruturas secretoras que produzem e liberam substâncias para atração e recompensa dos polinizadores são cruciais para o sucesso reprodutivo das angiospermas (TÖLKE et al., 2019), sendo os osmóforos e os nectários as principais estruturas relacionadas com o processo de polinização. As estruturas secretoras são caracterizadas por apresentarem células com denso conteúdo citoplasmático, núcleos conspícuos, presença de pequenos vacúolos, parede celular e cutícula delgada (FAHN, 2000; TÖLKE et al., 2019). Grãos de amido são encontrados em células ou tecidos secretores, pois são fonte de energia, e a ausência desses polissacarídeos pode indicar sua hidrólise para produção de compostos voláteis ou néctar (MELO et al., 2010). As células secretoras ainda podem ter abundância de mitocôndrias com cristas bem desenvolvidas,

indicando alta atividade metabólica, presença de ribossomos, retículo endoplasmático e vesículas (FAHN, 2000).

Nectários são tecidos especializados que secretam soluções aquosas com açúcares como sacarose, glucose e frutose, e podem conter outras substâncias em menor quantidade como aminoácidos, proteínas, íons, antioxidantes, lipídeos e terpenos (PACINI e NICOLSON, 2007). Os nectários florais geralmente são constituídos de uma epiderme com ou sem tricomas e um parênquima especializado (FAHN, 2000). Muitos nectários possuem uma cutícula contínua presente na superfície da epiderme, o que pode dificultar a liberação dessas substâncias, sendo assim, a cutícula pode sofrer rupturas, apresentando poros ou estômatos modificados (KETTLER et al., 2019; MELO et al., 2010) para a liberação do néctar. Observações macroscópicas em flores frescas são realizadas para distinguir a presença ou ausência de néctar, como em espécies do gênero *Epidendrum* L. (ALMEIDA e FIGUEIREDO, 2003; PANSARIN e AMARAL, 2008). Entretanto, essa metodologia pode não ser adequada, pois algumas espécies produzem menor quantidade de néctar, dificultando a visualização, como relatado no trabalho de Stpiczyńska et al. (2018). Nesse trabalho, os autores realizaram análises em microscopia de luz e eletrônica em algumas espécies do gênero *Epidendrum* L., e observaram que espécies que eram consideradas sem recompensa, na verdade apresentam secreções semelhante a néctar em seus *spurs* (STPICZYŃSKA et al., 2018).

Na família Orchidaceae, nectários geralmente estão localizados na face adaxial dos labelos (DRESSLER, 1993), porém há registro de nectários na base das sépalas na face abaxial de espécies do gênero *Cohniella* Pfitzer (KETTLER et al., 2019) e gotículas de néctar sendo liberadas nas sépalas em *Specklinia* Lindl. (KARREMANS et al., 2015).

Os osmóforos (glândulas de odores), produzem e liberam compostos voláteis, associados com a atração ou recompensa dos polinizadores, geralmente localizados com a utilização do teste histoquímico vermelho neutro, devido seu caráter lipídico (VOGEL, 1990). As fragrâncias das flores são geralmente compostas de terpenos, benzenoides, fenilpropanoides, derivados de ácidos graxos e compostos nitrogenados que possuem baixo peso molecular e polaridade o que facilita a volatilidade (TÖLKE et al., 2019). A caracterização dos compostos voláteis pode ser um importante marcador químico, como relatado para algumas espécies da subtribo Pleurothallidinae onde os alcanos são o constituinte principal do buquê floral (CARDOSO-GUSTAVSON et al., 2017).

Os compostos voláteis podem ser liberados através da difusão cuticular, como relatado em algumas espécies do gênero *Scaphosepalum* Pfitzer (PRIDGEON e STERN, 1985) e *Cirrhaea* Lindl. (PANSARIN et al., 2014b), através de micro canais cuticulares como em algumas espécies do gênero *Bulbophyllum* Thouars (KOWALKOWSKA et al., 2015, 2017; STPICZYŃSKA et al., 2015), poros como em *Restrepia* Kunth (PRIDGEON e STERN, 1983) ou estômatos tais como os observados em *Acianthera* Scheidw (MELO et al., 2010).

Na família Orchidaceae, os osmóforos podem ser caracterizados por papilas e/ou tricomas (KOWALKOWSKA et al., 2017; 2015; MELO et al., 2010, TEIXEIRA et al., 2004) ou células epidérmicas não diferenciadas (PANSARIN et al., 2014b). Apesar de geralmente presentes na face adaxial de sépalas (KOWALKOWSKA et al., 2017; 2015; MELO et al., 2010), pétalas (KOWALKOWSKA et al., 2017, 2015) ou labelos (TEIXEIRA et al., 2004), há relatos de osmóforos na face abaxial do labelo na espécie *Cyclopogon elatus* (Sw.) Schltr (WIEMER et al., 2009).

## MECANISMOS DE POLINIZAÇÃO POR ENGODO

As orquídeas podem atrair polinizadores através de estímulos visuais ou olfatórios sem oferecer recompensa, caracterizando assim a polinização por engodo (VAN DER PIJL & DODSON, 1966). Um dos mecanismos de polinização por engodo mais comum dentro da família são flores que liberam odores através de osmóforos e não possuem néctar ou outro tipo de recompensa alimentar (JERSÁKOVA et al., 2006). Esses casos de polinização foram relatos em espécies dos gêneros *Cattleya* Lindl. (SMIDT et al., 2006), *Sophronitis* Lindl. (SILVA-PEREIRA et al., 2007), *Cyrtopodium* R.Br. (PANSARIN et al., 2008) e *Vanilla* Plum. ex. Mill (PANSARIN et al., 2014a), que liberam apenas odores através dos osmóforos e não possuem recompensa.

Flores com coloração púrpura e amarela com manchas roxas, odores desagradáveis e ausência de néctar, atraem polinizadores que buscam locais que aparentam ter matéria orgânica em decomposição, para a postura de ovos pela fêmea (PROCTOR et al., 1996). Esse tipo de síndrome foi observado no gênero *Acianthera* Scheidw (Pleurothallidinae), que possui espécies que não oferecem recurso alimentar como recompensa aos polinizadores, atraindo através de odores moscas que utilizam as peças florais para deposição de ovos (oviposição) (BORBA e SEMIR, 2001).



Alguns polinizadores, principalmente as fêmeas, precisam de reservas alimentares ricas em proteínas para a produção de ovos, geralmente se alimentando de insetos. Espécies como as do gênero *Trichosalpinx* Luer apresentam um complexo sistema enganoso que envolve cor, fragrância, tricomas e movimento do labelo, que em conjunto simulam insetos, atraindo mosquitos fêmeas que necessitam de reservas proteicas para a produção de ovos (BOGARÍN et al., 2018). Flores que liberam pequenas quantidades de açúcares e proteínas nas sépalas, teriam o intuito de incentivar o forrageamento dos polinizadores (DAVIES e STPICZYŃSKA, 2012).

A decepção sexual, como a pseudocopulação, é outro mecanismo de polinização por engodo, no qual as flores liberam odores que simulam feromônios que atraem mosquitos machos com instinto de copulação. Espécies do gênero *Lepanthes* Sw., são polinizadas por esse mecanismo, no qual, além dos odores, o apêndice do labelo simula o abdômen da fêmea do polinizador, instigando os instintos de cópula do mosquito na flor (BLANCO e BARBOZA, 2005).

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A.M.; FIGUEIREDO, R.A. Ants visit nectaries of *Epidendrum denticulatum* (Orchidaceae) in a Brazilian rainforest: effects on herbivory and pollination. **Brazilian Journal of Biology**, v. 63, p. 551-558, 2003.
- BLANCO, M.A.; BARBOZA, G. Pseudocopulatory pollination in *Lepanthes* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) by fungus gnats. **Annals of Botany**, v. 95, p. 763-772, 2005.
- BOGARÍN, D.; FERNÁNDEZ, M.; BORKENT, A.; HEEMSKERK, A.; PUPULIN, F.; RAMÍREZ, S.; SMETS, E.; GRAVEMDEEL, B. Pollination of *Trichosalpinx* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) by biting midges (Diptera: Ceratopogonidae), **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 186, p. 510-543, 2018.
- BOLSON, M.; SMIDT, E.C. *Barbosella* In: **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB11177>>. Acesso em: 20 out. 2019.
- BORBA, E.L.; SEMIR, J. Pollinator specificity and convergence in fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: a multiple population approach. **Annals of Botany**, v. 88, p. 75-88, 2001.
- CARDOSO-GUSTAVSON, P.; SOUZA, S.R.; BARROS, F. Floral volatile profile in Pleurothallidinae, an orchid subtribe pollinated by flies: ecological and phylogenetic considerations. **Phytochemistry Letters**, v. 22, p. 49-55, 2017.
- CHASE, M.W.; CAMERON, K.M.; FREUDENSTEIN, J.V.; PRIDGEON, A.M.; SALAZAR, G.; van den BERG, C.; SCHUITMAN, A. An updated classification of Orchidaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 177, p. 151-174, 2015.
- DAVIES, K.L.; STPICZYŃSKA, M. Comparative labellar anatomy of resin-secreting and putative resin-mimic species of *Maxillaria* s.l. (Orchidaceae: Maxillariinae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 170, p. 405-435, 2012.
- DRESSLER, R.L. **The orchids natural history and classification**. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, and London, England. 1990.
- DRESSLER, R.L. **Phylogeny and classification of the orchid family**. Portland: Dioscorides Press., p. 10-30, 1993.
- FAHN, A. Structure and function of secretory cells. **Advances in botanical research**, v. 31, p. 37-76, 2000.
- FREUDENSTEIN, J.V.; CHASE, M.W. Phylogenetic relationships in Epidendroideae (Orchidaceae), one of the great flowering plant radiations: progressive specialization and diversification. **Annals of Botany**, v. 115, p. 665-681, 2015.
- GIVNISH, T.J.; SPALINK, D.; AMES, M.; LYON, S.P.; HUNTER, S.J.; ZULUAGA, A.; ILES, W.J.D.; CLEMENTS, M.A.; ARROYO, M.T.K.; LEEBENS-MACK, J.; ENDARA, L.; KRIEBEL, R.; NEUBIG, K.M.; WHITTEN, W.M.; WILLIAMS, N.H.; CAMERON, K.M.

Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 282, p. 1–10, 2015.

JERSÁKOVÁ, J.; JOHNSON, S.D.; KINDLMANN, P. Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. **Biological reviews**, v. 81, p. 219–235, 2006.

KARREMANS, A.P.; PUPULIN, F.; GRIMALDI, D.; BEENTJES, K.K.; BUTO, R.; FAZZI, G.E.; KASPERS, K.; KRUIZINGA, J.; ROESSINGH, P.; SMETS, E.F.; GRAVENDEE, B. Pollination of *Specklinia* by nectar-feeding *Drosophila*: the first reported case of a deceptive syndrome employing aggregation pheromones in Orchidaceae. **Annals of Botany**, p. 1–19, 2015.

KARREMANS, A.P. Genera Pleurothallidarum: an updated phylogenetic overview of Pleurothallidinae. **Lankesteriana**, v. 16, p. 219–242, 2016.

KETTLER, B.A.; SOLÍS, S.M.; FERRUCCI, M.S. Comparative survey of secretory structures and floral anatomy of *Cohniella cepula* and *Cohniella jonesiana* (Orchidaceae: Oncidiinae). New evidences of nectaries and osmophores in the genus. **Protoplasma**, v. 256, p. 703–720, 2019.

KOWALKOWSKA, A.K.; KOZIERADZKA-KISZKURNO, M.; TURZYŃSKI, S. Morphological, histological and ultrastructural features of osmophores and nectary of *Bulbophyllum wendlandianum* (Kraenzl.) Dammer (B. section Cirrhopetalum Lindl., Bulbophyllinae Schltr., Orchidaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 301, p. 609–622, 2015.

KOWALKOWSKA, A.K.; TURZYŃSKI, S.; KOZIERADZKA-KISZKURNO, M.; WIŚNIEWSKA, N. Floral structure of two species of *Bulbophyllum* section Cirrhopetalum Lindl.: *B. weberi* Ames and *B. cumingii* (Lindl.) Rchb. f. (Bulbophyllinae Schltr., Orchidaceae). **Protoplasma**, v. 254, p. 1431–1449, 2017.

LUER, C.A. Icones Pleurothallidarum I. Systematics of the Pleurothallidinae (Orchidaceae). **Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden**, v. 15, p. 29–34, 1986.

LUER, C.A. Icones Pleurothallidarum XX. Systematics of *Jostia*, *Andinia*, *Barbosella*, *Barbrodria*, *Pleurothallis* subgen. *Antilla*, subgen. *Effusia*, subgen. *Restrepioidea*. Addenda to *Lepanthes*, *Masdevallia*, *Platystele*, *Pleurothallis*, *Restrepiopsis*, *Scaphosepalum* and *Teagueia*. **Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden**, v. 79, p. 7–38, 2000.

LUER, C.A. Icones Pleurothallidarum XXIV: A First Century of New Species of *Stelis* of Ecuador, Part One. Addenda to *Barbosella*, *Dracula*, *Dresslerella*, *Lepanthopsis*, *Platystele*, *Pleurothallis*, *Restrepia*, *Scaphosepalum*, *Teagueia*, and *Trichosalpinx*. **Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden**, v. 88, p. 97–122, 2002.

MELO, M.C.; BORBA, E.L.; PAIVA, E.A.S. Morphological and histological characterization of the osmophores and nectaries of four species of *Acianthera* (Orchidaceae: Pleurothallidinae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 286, p. 141–151, 2010.

PACINI, E.; NICOLSON, S.W. In: NICOLSON, S.W.; NEPI, M; PACINI, E. (EDS) **Nectaries and Nectar**. Dordrecht: Springer. Springer, p.1-18, 2007.

PANSARIN, L.M.; PANSARIN, E.R.; SAZIMA, M. Reproductive biology of *Cyrtopodium polyphyllum* (Orchidaceae): a Cyrtopodiinae pollinated by deceit. **Plant Biology**, v.10, p. 650-659, 2008.

PANSARIN, E.R.; AMARAL, M.D.C.E.D. Reproductive biology and pollination mechanisms of *Epidendrum secundum* (Orchidaceae). Floral variation: a consequence of natural hybridization? **Plant Biology**, v. 10, p. 211-219, 2008.

PANSARIN, E.R.; AGUIAR, J.M.; PANSARIN, L.M. Floral biology and histochemical analysis of *Vanilla edwallii* Hoehne (Orchidaceae: Vanilloideae): an orchid pollinated by Epicharis (Apidae: Centridini). **Plant Species Biology**, v. 29, p. 242-252, 2014a.

PANSARIN, L.M.; PANSARIN, E.R.; SAZIMA, M. Osmophore structure and phylogeny of *Cirrhaea* (Orchidaceae, Stanhopeinae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 176, p. 369-383, 2014b.

PRIDGEON, A.M. Diagnostic anatomical characters in the Pleurothallidinae (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, v. 69, p. 921-938, 1982a.

PRIDGEON, A.M. Numerical analyses in the classification of the Pleurothallidinae (Orchidaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 85, p. 103-131, 1982b.

PRIDGEON, A.M.; STERN, W.L. Ultrastructure of osmophores in *Restrepia* (Orchidaceae). **American Journal of Botany**, v. 70, p. 1233-1243, 1983.

PRIDGEON, A.M.; STERN, W.L. Osmophores of *Scaphosepalum* (Orchidaceae). **Botany Gazette**, v. 146, p. 115-123, 1985.

PRIDGEON, A.M.; CHASE M.W. A phylogenetic reclassification of Pleurothallidinae (Orchidaceae). **Lindleyana**, v. 16, p. 235-271, 2001.

PRIDGEON, A.M. Subtribe Pleurothallidinae. In: PRIDGEON, A.M.; CRIBB, P.J.; CHASE, M.W.; RASMUSSEN, F.N. (Eds.), **Genera Orchidacearum**. Epidendroideae (Part One), Vol. 4. Oxford: Oxford University Press, p. 405-412, 2005.

PRIDGEON, A.M. In: **Anatomy of the Monocotyledons x Orchidaceae**. Stern, W. Oxford, University Press, p. 1-42, 2014.

PROCTOR, M.; YEO, P.; LACK, A. **The natural history of pollination**. Harper Collins Publishers, 1996.

SILVA-PEREIRA, V.; SMIDT, E.C; BORBA, E.L. Isolation mechanisms between two sympatric *Sophronitis* (Orchidaceae) species endemic to Northeastern Brazil. **Plant Systematics and Evolution**, v. 269, p. 171-182, 2007.

SMIDT, E.C.; SILVA-PEREIRA, V., BORBA, E.L. Reproductive biology of two *Cattleya* (Orchidaceae) species endemic to north-eastern Brazil. **Plant Species Biology**, v. 21, p. 85-91, 2006.

STPICZYŃSKA, M.; DAVIES, K.L.; KAMIŃSKA, M. Diverse labellar secretions in African *Bulbophyllum* (Orchidaceae: Bulbophyllinae) sections *Ptiloglossum*, *Oreonastes* and *Megaclinium*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 179, p. 266-287, 2015.

STPICZYŃSKA, M.; KAMIŃSKA, M.; DAVIES, K.L.; PANSARIN, E.R. Nectar-secreting and nectarless *Epidendrum*: structure of the inner floral spur. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 1-21, 2018.

TEIXEIRA, S.D.P.; BORBA, E.L.; SEMIR, J. Lip anatomy and its implications for the pollination mechanisms of *Bulbophyllum* species (Orchidaceae). **Annals of Botany**, v. 93, p. 499-505, 2004.

TÖLKE, E.D.; CAPELLI, N.D.V.; PASTORI, T.; ALENCAR, A.C.; COLE, T.C.; DEMARCO, D. Diversity of floral glands and their secretions in pollinator attraction. **Co-Evolution of Secondary Metabolites**, p. 709-754, 2019.

VAN DER PIJL, L.; DODSON, C.H. **Orchids flowers. Their pollination and evolution.** Coral Gables, FL: University of Miami Press., p. 101–122, 1966.

VOGEL, S. **The role of scent glands in pollination: on the structure and function of osmophores**, Amerind Publishing, 1990.

WIEMER, A.P.; MORE, M.; BENITEZ-VIEYRA, S.; COCUCCI, A.A.; RAGUSO, R.A.; SÉRSIC, A.N. A simple floral fragrance and unusual osmophore structure in *Cyclopogon elatus* (Orchidaceae). **Plant Biology**, v. 11, p. 506-514, 2009.

## Capítulo 1

### **Estudo comparativo em flores do gênero *Barbosella* Schltr. (Orchidaceae: Pleurothallidinae): evidência de polinização por engodo?**

Angela Cristina dos Santos Forstner<sup>1</sup>, Eric de Camargo Smidt<sup>1</sup> & Érika Amano<sup>1</sup>

*<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Botânica, Departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Brazil*

(Capítulo formatado conforme as normas do periódico *Plant Biosystems*)



## Resumo

As orquídeas podem atrair seus polinizadores através de sinais visuais e olfatórios, sem de fato oferecer algum tipo de recompensa, caracterizando esse mecanismo como polinização por engodo. Outras orquídeas podem apresentar osmóforos e nectários, como estruturas secretoras relacionadas com o processo de polinização. Nesse trabalho investigamos a presença de estruturas secretoras relacionadas com o mecanismo de atração e possíveis recompensas de nove espécies do gênero *Barbosella*. Para isso, realizamos testes histoquímicos em flores frescas e analisamos o material em microscopia de luz e eletrônica de varredura. As espécies possuem características compatíveis com a miofilia, como a redução das peças florais e liberação de odores, características descritas em outras espécies dentro da subtribo Pleurothallidinae. Os osmóforos estão localizados nas sépalas, pétalas e labelos de distribuição variada, sendo caracterizados por papilas, tricomas ou células não papilosas. As espécies possuem um canal com células secretoras, e através dos testes histoquímicos, constatamos a presença de pequenas quantidades de proteínas nessa região em todas as espécies, exceto em *B. cucullata*, *B. crassifolia* e *B. miersii*. As pequenas quantidades de proteínas oferecidas incentivam a visita e permanência dos polinizadores nas flores, porém, esses vestígios de recompensas podem ser considerados como enganosos.

## Introdução

As flores podem atrair polinizadores através de sinais visuais e olfatórios, sem de fato oferecer algum tipo de recompensa, caracterizando esse tipo de mecanismo como polinização por engodo (van der Pijl & Dodson 1966). Essas pistas químicas ou visuais podem simular recursos alimentares, presas, parceiros sexuais ou local para oviposição (Cozzolino & Widmer 2005). Na família Orchidaceae Juss., espécies dos gêneros *Cattleya* Lindl. (Smidt et al. 2006), *Sophronitis* Lindl. (Silva-Pereira et al. 2007), *Cyrtopodium* R.Br. (Pansarin et al. 2008) e *Vanilla* Plum. ex. Mill (Pansarin et al. 2014), são polinizadas por engodo, pois suas flores liberam odores, atraindo os polinizadores, mas não oferecem nenhum tipo de recompensa.

Nectários e osmóforos são estruturas secretoras relacionadas com processo de polinização, sendo o odor responsável por atrair os polinizadores e o néctar uma das principais recompensas (Proctor et al. 1996). São caracterizados por apresentarem células com denso conteúdo citoplasmático, núcleos conspícuos, presença de pequenos e numerosos vacúolos, parede celular e cutícula delgada, grãos de amido, que podem ou não estar presentes, abundância de mitocôndrias e ribossomos (Fahn 2000; Tölke et al. 2019). Testes histoquímicos são importantes ferramentas para identificar quais substâncias os tecidos secretores produzem e secretam (Fahn 2000), sendo os osmóforos caracterizados por apresentarem substâncias de caráter lipídico (Vogel 1990), e os nectários por secretarem uma solução aquosa rica em açúcares e outras substâncias diluídas como proteínas, enzimas, aminoácidos, entre outros (Pacini & Nicolson 2007).

Orquídeas nas espécies dos gêneros *Maxillaria* Ruiz & Pav. (Davies & Turner 2004), *Bulbophyllum* Thouars (Teixeira et al. 2004; Nunes et al. 2014, 2015, 2017; Kowalkowska et al. 2015; Stpiczyńska et al. 2015), *Epicactis* (L.) Crantz (Kowalkowska et al. 2018), *Epidendrum* L. (Leão et al. 2019) e *Cohniella* Pfitzer (Kettler et al. 2019), são consideradas recompensadoras, pois, atraem os polinizadores e possuem néctar como recompensa.

Pleurothallidinae Lindl. subtribo de distribuição neotropical, compreende aproximadamente 5.100 espécies e é o maior grupo dentro da família (Karremans 2016). Osmóforos e nectários na subtribo foram estudados através de técnicas de microscopia de luz, eletrônica de varredura e transmissão em espécies de *Acianthera* Scheidw, no qual indicaram a presença de osmóforos nas sépalas e nectários no labelo (de Melo et al. 2010). Osmóforos também foram identificados na sépala dorsal e pétalas de *Restrepia* H.B.K. (Pridgeon & Stern 1983) e sépalas de *Scaphosepalum* Pfitzer (Pridgeon & Stern 1985). Os nectários em Pleurothallidinae são frequentemente encontrados no labelo (Borda & Semir 2001, Barbosa et

al. 2009, de Melo et al. 2010), porém há registro de néctar sendo liberado em sépalas dorsais e laterais em *Specklinia* Lindl. (Karremans et al. 2015).

Mecanismo de polinização por engodo ocorre na subtribo em algumas espécies do gênero *Acianthera* Scheidw, que possui indivíduos que possuem néctar para oferecer aos polinizadores, e outros que suas flores liberam odores para atração de moscas que utilizam as peças florais para oviposição, sem apresentar recompensa alimentar (Borda & Semir 2001). Flores do gênero *Trichosalpinx* Luer apresentam um complexo sistema enganoso envolvendo cor, fragrância, tricomas e movimento do labelo, que em conjunto simulam possíveis presas de mosquitos fêmeas que utilizam insetos como fonte de proteínas para a produção de ovos (Bogarín et al. 2018). Decepção sexual, como a pseudocopulação é outro mecanismo de polinização por engodo relatado na subtribo em flores do gênero *Lepanthes* Sw., as quais atraem mosquitos machos através de odores, e o apêndice do labelo que imita o abdômen da fêmea do polinizador, instigando os instintos de cópula do mosquito na flor (Blanco & Barboza 2005).

O gênero *Barbosella* Schltr (Pleurothallidinae) é monofilético com distribuição disjunta na Mata Atlântica e nos Andes (Pridgeon 2005). Possui 20 espécies das quais nove ocorrem no Brasil e oito são endêmicas da Mata Atlântica (Bolson & Smidt 2019). São plantas geralmente epífitas, de pequeno a médio porte e inflorescência com uma única flor (Luer 1986, 2000; Pridgeon 2005). As flores são geralmente pequenas, com sépalas e pétalas de coloração amarelas e castanhas e o labelo pode conter manchas, projeções e/ou canais, características típicas de plantas polinizadas por moscas (miofilas) (van der Pijl & Dodson 1966; Luer 1986, 2000). Apesar dessas características serem compatíveis com a miofilia descrita para as espécies da subtribo, ainda não temos conhecimento da morfologia e anatomia das estruturas secretoras e quais substâncias essas estruturas liberam.

Portanto, o presente estudo tem como objetivo investigar comparativamente nove espécies de *Barbosella*, sendo oito brasileiras, quanto a presença de estruturas secretoras relacionadas com o mecanismo de atração e possíveis recompensas aos polinizadores, a fim de caracterizar o gênero quanto ao tipo de engodo.

## **Material e Métodos**

Flores de até dois dias de antese de nove espécies do gênero *Barbosella* (Fig. 1), foram coletadas dos indivíduos cultivados na casa de vegetação do Departamento de Botânica da UFPR (Tabela 1). As flores foram fixadas em solução de Karnovsky (Karnovsky 1965 modificado em Kraus & Arduin 1997) e processadas para análise em microscopia de luz (ML) e eletrônica de varredura (MEV).

Para a MEV, as flores foram desidratadas em série etílica, submetidas ao ponto crítico em CO<sub>2</sub> líquido, montadas em stubs e metalizadas em ouro. As análises das amostras foram realizadas no microscópio eletrônico de varredura TESCAN VEGA3 LMU.

Os testes histoquímicos foram realizados em flores frescas submersas por 20 minutos nos reagentes para detecção das principais classes de compostos químicos: amido com lugol (Johansen 1940), lipídeos com sudan III (Sass 1951), substâncias fenólicas com cloreto férrico (Johansen 1940), proteínas com azul brilhante de Coomassie (Fisher 1968) e áreas de emissão de fragrância com vermelho neutro (Vogel 1990). Esses testes histoquímicos foram aplicados em flores frescas ou secções de peças florais como proposto por Davies & Stpiczyńska (2014), Duque-Buitrago et al. (2014), Nunes et al. (2014), Stpiczyńska et al. (2015), Bogarín et al. (2018), Kowalkowska et al. (2018) e Leão et al. (2019). As imagens foram registradas em Estereomicroscópio Leica MZ16, com câmera fotográfica Leica DFC 500 com módulo Leica Las 3D View e IasMontage acoplada.

Para a ML, as flores foram desidratadas em série etílica, infiltradas e incluídas em resina glicol metacrilato (Leica Historesin Embedding Kit, Leica Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. Secções transversais e longitudinais de 4µm foram realizadas em micrótomo rotativo Leica RM2145 e coradas com azul de Toluidina 0,05% em tampão fosfato (O'Brien et al. 1964). Testes histoquímicos foram aplicados nas secções, com seus respectivos controles, como os utilizados nas flores frescas, exceto sudan III, e com a adição do teste para detecção de polissacarídeos insolúveis com reação de Ácido Periódico - Reagente de Schiff (PAS) (McManus 1948). As secções foram registradas em microscópio Olympus BX41 com câmera SC30 acoplada.

## Resultados

As plantas são geralmente epífitas com inflorescência com uma única flor. As flores são de tamanho variável, desde espécies com flores de 2mm como *B. miersii* (Fig. 1A) a flores de 5cm como na espécie *B. cucullata* (Fig. 1B-C). As sépalas e pétalas são de coloração semelhante entre si (Fig. 1A, D-M), exceto *B. cucullata* que possui sépala dorsal e pétalas amareladas e a sépala lateral é avermelhada (Fig. 1C). As sépalas e pétalas de *B. australis* e *B. trilobata* possuem regiões de cor púrpura (Fig. 1D-E, G). Em algumas espécies, as sépalas laterais são quase totalmente unidas (Fig. 1B-C, G, I, K). As pétalas são menores em relação as sépalas (Fig. 1A-E, G, I-M). Os labelos possuem um canal e base côncava em todas as espécies (Fig. 1F, H), exceto *B. miersii* que não possui essa base côncava. Os labelos são de coloração semelhantes com as demais peças florais (Fig. 1A, I) ou possuem manchas púrpuras em praticamente toda a extensão (Fig. 1C, F, H, J), na região mediana e proximal (Fig. 1K-L) ou apenas na margem (Fig. 1M).

### ***Micromorfologia***

Em vista frontal da face adaxial das sépalas e pétalas foram observadas papilas, intercaladas com células epidérmicas comuns (Tabela 2). Nas sépalas dorsais, as papilas estão distribuídas ao longo da peça em *B. cogniauxiana*, *B. cucullata*, *B. dusenii* (Fig. 2A), no ápice e porção mediana em *B. australis*, *B. gardneri*, *B. macaheensis* (Fig. 2B), no ápice e margem em *B. miersii* (Fig. 2C), e em *B. crassifolia* e *B. trilobata* a epiderme é composta de células não papilosas (Fig. 2D). Nas sépalas laterais as papilas estão no ápice em *B. crassifolia* e *B. trilobata*, ápice e margem em *B. miersii* (Fig. 2E) e ao longo da peça nas demais espécies (Fig. 2F). Em *B. cucullata* observou-se papilas ao longo da peça e tricomas na região mediana e basal da sépala lateral (Fig. 2G), além disso, observou-se secreções entre as papilas do ápice e região mediana (Fig. 2H). Nas pétalas, as papilas estão distribuídas no ápice e porção mediana em *B. australis*, *B. cogniauxiana* (Fig. 2I) *B. dusenii*, ao longo da peça em *B. cucullata*, e no ápice e margem nas demais espécies (Fig. 2J), exceto em *B. crassifolia* possui a epiderme não papilosa.

Estômatos foram observados em todas sépalas e pétalas (Fig. 2K), exceto nas pétalas de *B. crassifolia*, *B. cucullata*, *B. dusenii* e *B. miersii* (Tabela 2).

Poros foram observados na superfície das papilas nas sépalas e pétalas de *B. australis*, *B. cogniauxiana* (Fig. 2L), *B. gardneri*, *B. macaheensis* e *B. miersii*, sépala dorsal e pétala de *B. cucullata* e sépalas de *B. dusenii*.

O labelo é trilobado em *B. australis* (Fig. 3A), *B. crassifolia*, *B. gardneri*, *B. macaheensis*, *B. miersii* e *B. trilobata* (Fig. 3B) e inteiro nas demais espécies (Fig. 3C-E) (Tabela 2). Nos lobos dos labelos trilobados, observou-se cutícula estriada (Fig. 3F), exceto em *B. australis* e *B. macaheensis*. Os labelos apresentam uma base côncava que é articulada ao pé da coluna (Fig. 3G-H, J), com exceção de *B. miersii* que não possui a base côncava (Fig. 3I). Essa base possui tricomas e papilas em todas as espécies (Fig. 3G, J), exceto em *B. crassifolia*



e *B. trilobata* (Fig. 3H). Na região proximal, os labelos possuem um canal que tem comprimento variado entre as espécies, sendo geralmente menor que um terço do comprimento do labelo (Tabela 2) (Fig. 3H, J). Esse canal possui papilas (Fig. 3I, K) ou tricomas (Fig. 3G) em todas as espécies, exceto *B. crassifolia* e *B. trilobata* (Fig. 3H). Todas as espécies possuem no ápice papilas imbricadas (Fig. 3L), exceto *B. crassifolia* e *B. trilobata* que possuem papilas intercaladas com células epidérmicas comuns (Fig. 3M). Observou-se poros nas papilas do ápice do (Fig. 3N).

### ***Testes histoquímicos***

Osmóforos foram localizados na face adaxial das sépalas, pétalas e labelos das espécies analisadas (Tabela 3). Nas sépalas dorsais, os osmóforos estão distribuídos no ápice em *B. crassifolia* (Fig. 4A-B), *B. gardneri* e *B. miersii* (Fig. 4C-D), ápice e porção mediana em *B. dusenii* e *B. macaheensis* (Fig. 4E-F), ao longo da peça em *B. australis* (Fig. 4G) e *B. cogniauxiana* e apenas na margem em *B. cucullata*. Nas sépalas laterais, os osmóforos estão distribuídos no ápice em *B. crassifolia* (Fig. 4A-B), *B. gardneri*, *B. miersii* (Fig. 4C-D) e *B. trilobata*, ao longo da peça em *B. australis*, *B. cogniauxiana* e *B. dusenii* e ápice e porção mediana em *B. macaheensis* (Fig. 4E-F). Nas pétalas, os osmóforos estão distribuídos no ápice em *B. crassifolia* (Fig. 4A-B), *B. gardneri* e *B. macaheensis* (Fig. 4E-F) e *B. miersii* (Fig. 4C-D), ao longo da peça em *B. australis* (Fig. 4G), ápice e margem em *B. cogniauxiana* e apenas na margem em *B. cucullata* e *B. dusenii*. Osmóforos foram localizados no ápice do labelo em *B. cogniauxiana*, *B. crassifolia* (Fig. 4A-B), *B. dusenii* e *B. trilobata*, ao longo do labelo em *B. australis* (Fig. 4G) *B. cucullata* e *B. gardneri* e porção mediana em *B. miersii* (Fig. 4B).

Amido foi detectado nas diferentes peças florais das espécies analisadas (Tabela 3), sendo observado na face adaxial da sépala dorsal e laterais no ápice e porção mediana em *B.*

*dusenii* (Fig. 4H) e *B. gardneri* e ao longo da peça em *B. australis* (Fig. 4I), *B. cogniauxiana* e *B. miersii*, e ápice da sépala dorsal em *B. macaheensis* (Fig. 4J). Nas pétalas, amido foi observado no ápice em *B. dusenii* (Fig. 4H), *B. gardneri* e *B. macaheensis* (Fig. 4J) e ao longo da peça em *B. australis* (Fig. 4I), *B. cogniauxiana* e *B. miersii*. No labelo, amido foi detectado ao longo da peça em *B. australis* (Fig. 4I), *B. cogniauxiana*, *B. dusenii* (Fig. 4H), *B. gardneri* e *B. miersii* e nos ápices em *B. crassifolia* e *B. macaheensis* (Fig. 4J).

Proteínas foram observadas na face adaxial no ápice da sépala dorsal em *B. dusenii*, *B. gardneri* e *B. macaheensis* e o ápice e margem em *B. australis* e *B. cogniauxiana* (Fig. 4K) (Tabela 3). Nas sépalas laterais, proteínas foram detectadas na porção mediana e base em *B. australis* (Fig. 4L), *B. cogniauxiana* e *B. macaheensis* e ápice em *B. dusenii*. Nas pétalas, margem e porção mediana em *B. australis* (Fig. 4M) e *B. cogniauxiana* possuem proteínas, assim como o ápice em *B. dusenii* e ápice e margem em *B. macaheensis*. Nos labelos, proteínas foram observadas na região da base côncava e canal de *B. dusenii* (Fig. 4N).

### **Anatomia**

As sépalas e pétalas possuem epiderme uniestratificada ao longo da peça (Fig. 5A-H). A camada secretora está localizada no ápice na face adaxial e é composta de papilas em todas as espécies (Fig. 5B-D), exceto *B. crassifolia* que possui células de formato globoso na sépala dorsal e pétalas (Fig. 5A) e, *B. trilobata* que não possui células secretoras na sépala dorsal e pétalas (Fig. 5G). Essas células com características secretoras possuem denso conteúdo citoplasmático, núcleos conspícuos na porção basal da célula (Fig. 5D), vacúolos que podem ser grandes ou pequenos (Fig. 5B-D) e cutícula com rupturas (Fig. 5B-C). A sépala lateral de *B. cucullata* é a única peça floral que possui tricomas (Fig. 5B-C) e papilas (Fig. 5D) com características secretoras ao longo da sépala. O mesofilo das sépalas e pétalas é homogêneo

com pequenos espaços intercelulares (Fig. 5A-B, G). Idioblastos com ráfides (Fig. 5A) foram observados no ápice da sépala dorsal de *B. crassifolia* e *B. miersii* e no ápice das pétalas de *B. miersii*. As sépalas possuem mesofilo com três feixes vasculares (Fig. 5A, E), enquanto as pétalas possuem apenas um feixe vascular (Fig. 5F-H).

Através dos testes histoquímicos nas secções observou-se grãos de amido presentes em todos os tecidos nas sépalas dorsais em *B. cogniauxiana*, *B. crassifolia* e *B. trilobata* (Fig. 5A), concentrado próximo ao feixe vascular em *B. australis* e *B. cucullata*, disperso no parênquima em *B. dusenii* e ausente nas demais espécies (Tabela 4). Nas sépalas laterais, grãos de amido estão concentrados próximo ao feixe vascular em quase todas as espécies, exceto em *B. cogniauxiana*, *B. crassifolia* e *B. macaheensis* que possuem em todos os tecidos, e *B. miersii* e *B. trilobata* que possuem disperso no parênquima (Tabela 4). Nas pétalas, grãos de amido foram observados concentrado próximo ao feixe vascular em *B. australis*, *B. cucullata*, *B. dusenii* e *B. gardneri*, distribuído em todos os tecidos em *B. cogniauxiana* e *B. crassifolia* e disperso no parênquima nas demais espécies (Fig. 5F), exceto em *B. miersii* que estão ausentes (Tabela 4).

A epiderme em toda a extensão dos labelos é uniestratificada, sendo essa região secretora em todas as espécies (Fig. 6A), exceto em *B. macaheensis* que não possui células secretoras no ápice e região mediana (Fig. 6B). Nos canais, a região secretora pode ser composta de tricomas (Fig. 6C), papilas (Fig. 6D), células epidérmicas e mais uma camada subepidérmica como em *B. trilobata* (Fig. 6E-F) ou células epidérmicas e mais cinco camadas subepidérmicas como em *B. crassifolia* (Fig. 6G). Em *B. crassifolia* e *B. trilobata* as células secretoras do canal estão restritas a porção central do labelo (Fig. 6E-G). Observou-se secreção no canal do labelo de *B. australis*, *B. crassifolia* e *B. trilobata* (Fig. 6G, H). A epiderme da base côncava dos labelos é composta por células secretoras papilosas ou tricomas em todas as espécies (Fig. 6I). O mesofilo é composto de células do parênquima, com pequenos espaços intercelulares (Fig.

6J) e três feixes vasculares colaterais próximos a face abaxial (Fig. 6A, C, E). Idioblastos com ráfides foram observados nos ápices dos labelos de *B. crassifolia*, *B. dusenii* e *B. macaheensis* (Fig. 6J).

Os testes histoquímicos nas secções dos labelos revelaram que as células ao redor dos feixes vasculares possuem grãos de amido em todas as espécies, exceto *B. cucullata* e *B. macaheensis* que possuem amido disperso nas células do parênquima, e *B. australis*, *B. trilobata* e *B. miersii* que não se detectou amido (Tabela 4). Polissacarídeos insolúveis nos labelos foram detectados em todos os tecidos em *B. cogniauxiana* e *B. trilobata*, disperso no parênquima nas demais espécies, exceto em *B. miersii* (Tabela 4). Proteínas foram detectadas apenas na região do canal de todas as espécies (Fig. 6K-M), exceto em *B. crassifolia*, *B. cucullata* e *B. miersii* que não possuem proteínas em nenhum tecido.

## Discussão

As espécies analisadas do gênero *Barbosella* possuem características compatíveis com a miofilia, documentada em outros gêneros na subtribo Pleurothallidinae (Borba & Semir 2001; Barbosa et al. 2009; Millner & Baldwin 2016; Cardoso-Gustavson et al. 2017; Bogarín et al. 2018), como a redução das partes florais e a liberação de odores que em conjunto com as cores das peças florais atuam como sinais atrativos guiando e posicionando os polinizadores de forma a favorecer a polinização. A simetria bilateral (zigomórfica) das espécies de *Barbosella* também pode ser vantajosa no processo de atração, pois esse padrão de simetria facilita o manuseio pelos polinizadores, sendo preferencialmente visitadas, e consequentemente possuem maiores chances de polinização (Moller 2000).

Além dos osmóforos que atuam na atração dos polinizadores, as pequenas quantidades de proteínas encontradas nas papilas das sépalas e pétalas de *B. australis*, *B. cogniauxiana*, *B.*

*dusenii*, *B. gardneri* e *B. macaheensis* encorajam o forrageamento nas flores dessas espécies, pois essa substância cria sabores na superfície, o que estimula a visita dos polinizadores (Bogarín et al. 2018; Davies & Stpiczyńska 2012). Os canais dos labelos que também possuem proteínas, podem estar relacionados com o processo de atração, em vista que esse recurso é importante para as fêmeas produzirem ovos (Davies & Turner 2004; Davies & Stpiczyńska 2014). Entretanto, até o momento não foi observado ovos ou larvas, refutando a hipótese de atração por oviposição em flores da subtribo. Portanto, acreditamos que as proteínas no labelo são consideradas recompensas enganosas, sendo apenas um incentivo para o polinizador visitar e permanecer mais tempo na flor, aumentando as chances de contato com a coluna e posterior adesão das polínias no inseto.

Com as análises realizadas concluímos que os canais dos labelos nas espécies analisadas são secretores, sendo identificados como osmóforos em todas as espécies, exceto em *B. crassifolia*, *B. macaheensis* e *B. trilobata*. Apesar de não apresentarem osmóforos nos canais, *B. macaheensis* e *B. trilobata* possuem osmóforos nas demais peças florais, e liberam pequenas quantidades de proteínas no canal, atraindo o polinizador e permitindo que o tempo de visita seja maior. Apesar da natureza da composição química produzida no canal de *B. crassifolia* permanecer incerta, pelas nossas análises concluímos que estão relacionadas com o processo de atração e recompensa do polinizador.

*Barbosella australis* e *B. trilobata* com suas manchas ou listras purpuras nas sépalas e pétalas podem fornecer um contraste visual aos polinizadores (Policha et al. 2016), e esse padrão pode guiar o movimento do polinizador em direção a coluna, favorecendo a polinização.

A atratividade das flores *B. crassifolia*, *B. gardneri*, *B. miersii* e *B. trilobata* está relacionada não apenas com a presença de osmóforos e a coloração das peças florais, mas também com os labelos trilobados que possuem cutícula estriada. A luz sofre difração nesse

tipo de ornamentação, ocasionando o processo de iridescência (Whitney et al. 2009), e isso aumenta a atratividade dessas espécies pois atua como pistas visuais orientando os polinizadores no pouso.

A espécie andina *B. cucullata* diferencia quanto a região de liberação de odores em relação as espécies brasileiras analisadas no estudo. Além disso, a composição química da secreção dos tricomas e papilas da sépala lateral dessa espécie permanece incerta, porém pelas análises em microscopia de luz, concluímos que esses tricomas são secretores, portanto, relacionados com a produção e liberação de recompensa. A aplicação de testes para detecção de outras classes de compostos químicos, como mucilagens e néctar, seriam uma ferramenta importante para determinar o tipo de substância produzida por essas estruturas.

Os osmóforos nas espécies de *Barbosella* são caracterizados por papilas, tricomas e células não papilosas localizados nas diferentes peças florais, como registrado em outras espécies na subtribo (Melo et al. 2010; dos Santos et al. 2020). Esses tricomas ou papilas aumentam a superfície de contato, ampliando a dispersão de compostos voláteis em relação as espécies que possuem osmóforos com superfícies planas (Curry et al. 1991). Portanto, as espécies com tricomas e papilas liberam maior quantidade de odores, e isso pode ser uma vantagem em relação a distância de dispersão em comparação com as espécies que possuem osmóforos como células não papilosas. Em curtas distâncias, os compostos voláteis podem atuar de maneira semelhante aos guias visuais de néctar, direcionando os polinizadores e permitindo o posicionamento adequado do visitante para entrar em contato com a coluna e consequentemente com as polínias (Woodcok et al. 2014). Além disso, as espécies de *Barbosella* possuem uma articulação entre o pé da coluna e o labelo que permite que o labelo balance, promovendo o aumento da dissipação de odores localizados nessa peça floral (da Silva et al. 1999).



A ausência de estômatos e poros nos labelos sugere que as fragrâncias são liberadas através de difusão cuticular (Pridgeon & Stern 1985; Kowalkowska et al. 2015). A liberação de odores nas sépalas e pétalas dos osmóforos pode estar associada aos poros nas células (Pridgeon & Stern 1983) ou estômatos presentes (Melo et al. 2010). Para confirmação das funções dos estômatos e poros nas espécies de *Barbosella* seria importante estudar o mecanismo de secreção dos odores com análises ultraestruturais.

Grãos de amido se acumulam nos tecidos devido ao alto teor energético e pode ser utilizado como matéria prima na produção de compostos voláteis (Vogel 1990), fonte de açúcar para a síntese de néctar (Stpiczyńska et al. 2004) ou produção de energia para o processo secretório (Stpiczyńska et al. 2015). A ausência desses polissacarídeos nos osmóforos identificados nas espécies de *Barbosella*, indica a hidrólise para produção dos odores e energia necessária para o processo de secreção (Kowalkowska et al. 2015).

Concluimos que as espécies de *Barbosella* analisadas no trabalho apresentam um sistema enganoso que envolve liberação de odores pelas diferentes peças florais, ornamentação dos lobos do labelo, coloração das peças florais e as pequenas quantidades de proteínas encontradas em algumas espécies que apenas estimulam a visita e permanência dos polinizadores, aumentando as chances do sucesso reprodutivo.

## Referências

- Barbosa AR, de Melo MC, Borba EL. 2009. Self-incompatibility and myophily in *Octomeria* (Orchidaceae, Pleurothallidinae) species. *Plant Syst Evol.* 283(1-2), 1.
- Blanco MA, Barboza G. 2005. Pseudocopulatory pollination in *Lepanthes* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) by fungus gnats. *Ann Bot.* 95(5): 763-772.
- Bogarín D, Fernández M, Borkent A, Heemskerk A, Pupulin F, Ramírez S, Smets E, Gravendeel B. 2018. Pollination of *Trichosalpinx* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) by biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). *Bot J Linn Soc.* 186(4): 510-543.

Bolson M, Smidt EC. *Barbosella* In: Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. [accessed 2019 out 20]. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB11177>.

Borba EL, Semir J. 2001. Pollinator specificity and convergence in fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: a multiple population approach. *Ann Bot.* 88(1): 75-88.

Cardoso-Gustavson P, de Souza SR, de Barros F. 2017. Floral volatile profile in *Pleurothallidinae*, an orchid subtribe pollinated by flies: ecological and phylogenetic considerations. *Phytochem Let.* 22: 49-55.

Cozzolino S, Widmer A. 2005. Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? *Trends in Ecol & Evol.* 20(9): 487-494.

Curry KJ, McDowell LM, Judd WS, Stern WL. 1991. Osmophores, floral features, and systematics of *Stanhopea* (Orchidaceae). *Am J Bot.* 78(5): 610-623.

Davies KL, Turner MP. 2004. Morphology of floral papillae in *Maxillaria* Ruiz & Pav. (Orchidaceae). *Ann Bot.* 93(1): 75-86.

Davies KL, Stpiczyńska M. 2012. Comparative labellar anatomy of resin-secreting and putative resin-mimic species of *Maxillaria* sl. (Orchidaceae: Maxillariinae). *Bot J Linn Soc.* 170(3): 405-435.

Davies KL, Stpiczyńska M. 2014. Labellar anatomy and secretion in *Bulbophyllum* Thouars (Orchidaceae: Bulbophyllinae) sect. *Racemosae* Benth. & Hook. f. *Ann Bot.* 114(5): 889-911.

Duque-Buitrago CA, Alzate-Quintero NF, Otero JT. 2013. Nocturnal pollination by fungus gnats of the Colombian endemic species, *Pleurothallis marthae* (Orchidaceae: Pleurothallidinae). *Lankesteriana.* 13(3): 407-417.

Fahn A. 2000. Structure and Function of Secretory Cells. In: Hallahan DL, Gray JC, Callow JA. *Advances in Botanical Research, Incorporating Advances in Plant Pathology, Volume 31, Plant Trichomes*, Academic Press, London, 37-66.

Fisher DB. 1968. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. *Histochemie.* 16(1): 92-96.

Johansen DA. 1940. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill, New York, USA. p. 188-193.

Karremans AP, Pupulin F, Grimaldi D, Beentjes KK, Butôt R, Fazzi GE, Kaspers K, Kruizinga, J, Roessingh P, Smets EF, Gravendeel. 2015. Pollination of *Specklinia* by nectar-feeding *Drosophila*: the first reported case of a deceptive syndrome employing aggregation pheromones in Orchidaceae. *Ann Bot.* 116(3): 437-455.

Karremans AP. 2016. Genera *Pleurothallidinarum*: an updated phylogenetic overview of *Pleurothallidinae*. *Lankesteriana.* 16(2): 219-241.

- Kettler BA, Solís SM, Ferrucci MS. 2019. Comparative survey of secretory structures and floral anatomy of *Cohniella cepula* and *Cohniella jonesiana* (Orchidaceae: Oncidiinae). New evidences of nectaries and osmophores in the genus. *Protoplasma*. 256(3): 703-720.
- Kowalkowska AK, Kozieradzka-Kiszkurno M, Turzyński S. 2015. Morphological, histological and ultrastructural features of osmophores and nectary of *Bulbophyllum wendlandianum* (Kraenzl.) Dammer (B. section *Cirrhopetalum* Lindl., *Bulbophyllinae* Schltr., *Orchidaceae*). *Plant Syst Evol*. 301(2): 609-622.
- Kowalkowska AK, Pawłowicz M, Guzanek P, Krawczyńska AT. 2018. Floral nectary and osmophore of *Epipactis helleborine* (L.) Crantz (*Orchidaceae*). *Protoplasma*. 255(6): 1811-1825.
- Kraus JE, Arduim M. 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Editora Universidade Rural, Rio de Janeiro, Brasil. p. 94.
- Leão LCS, de Sá-Haiad B, de Araujo Rodarte AT, Pimentel RR, Benevides CR, de Santiago-Fernandes LDR, de Lima HÁ. 2019. Reproductive biology of two synchronopatric neotropical species of *Epidendrum* (*Orchidaceae*). *Flora*. 251: 95-104.
- Luer CA. 1986. *Icones Pleurothallidarum I, Systematics of the Pleurothallidinae*. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, 15: 1-19.
- Luer CA. 2000. *Icones Pleurothallidarum XX. Systematics of Jostia, Andinia, Barbosella, Basbrodria, Pleurothallis subgen. Antilla subgen. Effusia, subgen. Restrepioidia. Addenda to Lepanthes, Masdevallia, Platystele, Pleurothallis, Restrepiopsis, Scaphosepalum and Teagueia*. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden, 79: 7-38.
- McManus JFA. 1948. Histological and histochemical uses of periodic acid. *Stain Technology*. 23(3): 99-108.
- Melo MC, Borba EL, Paiva EAS. 2010. Morphological and histological characterization of the osmophores and nectaries of four species of *Acianthera* (*Orchidaceae*: *Pleurothallidinae*). *Plant Syst Evol*. 286(3-4): 141-151.
- Millner HJ, Baldwin TC. 2016. Floral micromorphology of the genus *Restrepia* (*Orchidaceae*) and the potential consequences for pollination. *Flora*. 225, 10-19.
- Moller AP. 2000. Developmental stability and pollination. *Oecologia*. 123(2): 149-157.
- Nunes ELP, Smidt EC, Stützel T, Coan AI. 2014. What do floral anatomy and micromorphology tell us about Neotropical *Bulbophyllum* section *Didactyle* (*Orchidaceae*: *Bulbophyllinae*)? *Bot J Linn Soc*. 175(3): 438-452.
- Nunes ELP, Smidt EC, Stützel T, Coan AI. 2015. Comparative floral micromorphology and anatomy of species of *Bulbophyllum* section *Napelli* (*Orchidaceae*), a Neotropical section widely distributed in forest habitats. *Bot J Linn Soc*. 177(3): 378-394.

Nunes ELP, Maldonado PE, Smidt EC, Stützel T, Coan AI. 2017. Floral micromorphology and anatomy and its systematic application to Neotropical *Bulbophyllum* section Micranthae (Orchidaceae). Bot J Linn Soc. 183(2): 294-315.

O'Brien TP; Feder N, McCully ME. 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. Protoplasma. 59(2): 368-373.

Pacini E, Nicolson SW. 2007. In: Nicolson SW, Nepi M, Pacini E. (eds) Nectaries and nectar. Dordrecht, Springer, p.1-18.

Teixeira SDP, Borba EL, Semir J. 2004. Lip anatomy and its implications for the pollination mechanisms of *Bulbophyllum* species (Orchidaceae). Ann Bot. 93(5): 499-505.

Pansarin LM, Pansarin ER, Sazima M. 2008. Reproductive biology of *Cyrtopodium polyphyllum* (Orchidaceae): a Cyrtopodiinae pollinated by deceit. Plant Biol. 10(5): 650-659.

Pansarin ER, Aguiar JM, Pansarin LM. 2014. Floral biology and histochemical analysis of *Vanilla edwallii* H oehne (Orchidaceae: Vanilloideae): an orchid pollinated by Epicharis (A pidae: C entridini). Plant Species Biol. 29(3): 242-252.

Policha T, Davis A, Barnadas M, Dentinger BT, Raguso RA, Roy BA. 2016. Disentangling visual and olfactory signals in mushroom-mimicking *Dracula* orchids using realistic three-dimensional printed flowers. New Phytologist. 210(3): 1058-1071.

Pridgeon AM, Stern WL. 1983. Ultrastructure of osmophores in *Restrepia* (Orchidaceae). Am J Bot. 70(8): 1233-1243.

Pridgeon AM, Stern WL. 1985. Osmophores of *Scaphosepalum* (Orchidaceae). Bot Gaz. 146(1): 115-123.

Pridgeon AM, Cribb PJ, Chase MW, Rasmussen FN. 2005. Genera *Orchidacearum*. Volume 4 Epidendroideae Part 1. London: Oxford University Press.

Proctor M, Yeo P, Lack A. 1996. The natural history of pollination Harper Collins Publishers London.

dos Santos TF, Amano E, dos Santos Forstner AC, Toscano de Brito ALV, Smidt EC. 2020. Floral Studies in *Octomeria* R. BR. (Orchidaceae: Pleurothallidinae). Feddes Repert. 0: 1-10.

Sass, J.E. 1951. Botanical microtechnique. (2nd. ed.) Ames, Iowa State College Press. 98.

Shrestha M, Dyer AG, Dorin A, Ren ZX, Burd M. 2020. Rewardlessness in orchids: how frequent and how rewardless? Plant Biol.

Silva-Pereira V, Smidt EC, Borba EL. 2007. Isolation mechanisms between two sympatric *Sophronitis* (Orchidaceae) species endemic to Northeastern Brazil. Plant Syst Evol. 269(3-4): 171-182.

da Silva UF, Borba EL, Semir J, Marsaioli AJ. 1999. A simple solid injection device for the analyses of *Bulbophyllum* (Orchidaceae) volatiles. *Phytochemistry*. 50(1), 31-34.

Smidt EC, Silva-Pereira V, Borba EL. 2006. Reproductive biology of two *Cattleya* (Orchidaceae) species endemic to north-eastern Brazil. *Plant Species Biol.* 21(2): 85-91.

Stpiczyńska M, Davies KL, Gregg A. 2004. Nectary structure and nectar secretion in *Maxillaria coccinea* (Jacq.) LO Williams ex Hodge (Orchidaceae). *Ann Bot.* 93(1): 87-95.

Stpiczyńska M, Davies KL, Kamińska M. 2015. Diverse labellar secretions in African *Bulbophyllum* (Orchidaceae: Bulbophyllinae) sections *Ptiloglossum*, *Oreonastes* and *Megaclinium*. *Bot J Linn Soc* 179(2): 266-287.

Tölke ED, Capelli NV, Pastori T, Alencar AC, Cole TCH, Demarco D. 2019. Diversity of floral glands and their secretions in pollinator attraction. In: *Co-Evolution of Secondary Metabolites*. Springer, p. 709-754.

van der Pijl L, Dodson CH. 1966. *Orchid flowers: their pollination and evolution*. University of Miami Press, Coral Gables, Florida, USA.

Vogel S. 1990. *Role of scent glands in pollination: on the structure and function of osmophores*. Amerind Publishing.

Whitney HM, Kolle M, Alvarez-Fernandes R, Steiner U, Glover B. 2009. Contributions of iridescence to floral patterning. *Commun Integr Biol.* 2(3): 230-232.

Woodcock TS, Larson BM, Kevan PG, Inouye DW, Lunau K. 2014. Flies and flowers II: floral attractants and rewards. *Journal of Pollination Ecology.* 12(8): 63-94.

**Tabela 1.** Lista de vouchers das espécies de *Barbosella* utilizadas no estudo e respectivas técnicas aplicadas. (TH) teste histoquímico, (ML) microscopia de luz, (MEV) microscopia eletrônica de varredura, (X) técnica aplicada.

<b>Espécie</b>	<b>Voucher (Herbário)</b>	<b>Localidade</b>	<b>TH</b>	<b>ML</b>	<b>MEV</b>
<i>Barbosella australis</i> (Cogn.) Schltr.	M.L. Klingelfus 294 (UPCB)	BRA, PR, Piraquara	x		
<i>B. australis</i>	M.L. Klingelfus 295 (UPCB)	BRA, PR, Tijucas do Sul	x	x	x
<i>B. australis</i>	D.C. Imig 650 (UPCB)	BRA, SC, São Bento	x	x	
<i>B. cogniauxiana</i> (Speg. & Kraenzl.) Schltr.	M.L. Klingelfus 113 (UPCB)	BRA, PR, Ponta Grossa	x	x	x
<i>B. crassifolia</i> (Edwall) Schltr.	M. Bolson 545 (UPCB)	BRA, PR, Pontal do Paraná	x	x	x
<i>B. crassifolia</i>	A.L.V. Toscano de Brito 3479 (UPCB)	BRA, ES, Venda Nova do Imigrante		x	
<i>B. cucullata</i> (Lindley) Schltr.	M. Bolson 534 (UPCB)	ECU, Guayaquil			x
<i>B. cucullata</i>	M. Bolson & A.C.S. Forstner 665 (UPCB)	ECU, Guayaquil	x	x	x
<i>B. dusenii</i> (A. Samp.) Schltr.	T. F. Santos 144 (UPCB)	BRA, PR, Morretes	x		
<i>B. dusenii</i>	M. Bolson et al. 610 (UPCB)	BR, PR, Piraquara	x		
<i>B. dusenii</i>	D.C. Imig & G.A. Mantovani 614 (UPCB)	BR, SC, Praia Grande	x	x	x
<i>B. gardneri</i> (Lindl.) Schltr.	M. Bolson et al. 536 (UPCB)	BRA, RJ, São José dos Pinhais	x		
<i>B. gardneri</i>	M. Bolson et al. 579 (UPCB)	BRA, ES, Santa Teresa	x		
<i>B. gardneri</i>	M. Bolson & D.C. Imig 659 (UPCB)	BRA, ES, Alfredo Chaves	x	x	x
<i>B. gardneri</i>	A.L.V. Toscano de Brito 3394 (UPCB)	BRA, SC, Joinville	x	x	x
<i>B. macaheensis</i> (Cogn.) Luer	M. Bolson 582 (UPCB)	BRA, ES, Santa Teresa	x		x
<i>B. macaheensis</i>	M. Bolson 647 (UPCB)	BRA, RJ, Nova Friburgo	x	x	x
<i>B. miersii</i> (Lindl.) Schltr.	M. Bolson et al. 518 (UPCB)	BRA, SC, Benedito Novo	x		
<i>B. miersii</i>	M. Bolson et al. 577 (UPCB)	BRA, ES, Santa Teresa	x	x	x
<i>B. miersii</i>	M. Bolson et al. 617 (UPCB)	BRA, RJ, Nova Friburgo	x		
<i>B. trilobata</i> Pabst	M.L. Klingelfus 155 (UPCB)	BRA, PR, Ponta Grossa	x	x	x

**Tabela 2.** Características florais das espécies do gênero *Barbosella*. (an) anfiestomática, (bc) base côncava, (ca) canal, (ep) epiestomática, (pa) papilas, (tr) tricomas, (+) presente, (-) ausente, (x) característica não observada.

Espécies	Sépala dorsal			Sépala lateral			Pétala		Labelo	
	Presença de tricomas/papilas	Estômatos	Presença de tricomas/papilas	Estômatos	Presença de tricomas/papilas	Estômatos	Formato	Distribuição dos tricomas/papilas	Comprimento do canal	
<i>Barbosella australis</i>	pa	ep	pa	an	pa	ep	trilobado	ca, bc	menor que 1/3	
<i>B. cogniauxiana</i>	pa	ep	pa	ep	pa	ep	inteiro	ca, bc	menor que 1/3	
<i>B. crassifolia</i>	pa	an	pa	an	pa	x	trilobado	ápice e porção mediana	menor que 1/3	
<i>B. cucullata</i>	pa	ep	pa, tr	an	pa	x	inteiro	ca, bc	metade do comprimento	
<i>B. dusenii</i>	pa	an	pa	ep	pa	x	inteiro	ca, bc	menor que 1/3	
<i>B. gardneri</i>	pa	an	pa	an	pa	ep	trilobado	ca, bc	menor que 1/3	
<i>B. macaheensis</i>	pa	an	pa	an	pa	ep	trilobado	ca, bc	menor que 1/3	
<i>B. miersii</i>	pa	ep	pa	ep	pa	x	trilobado	ca	aproximadamente 1/3	
<i>B. trilobata</i>	pa	an	pa	an	pa	ep	trilobado	ápice e porção mediana	metade do comprimento	

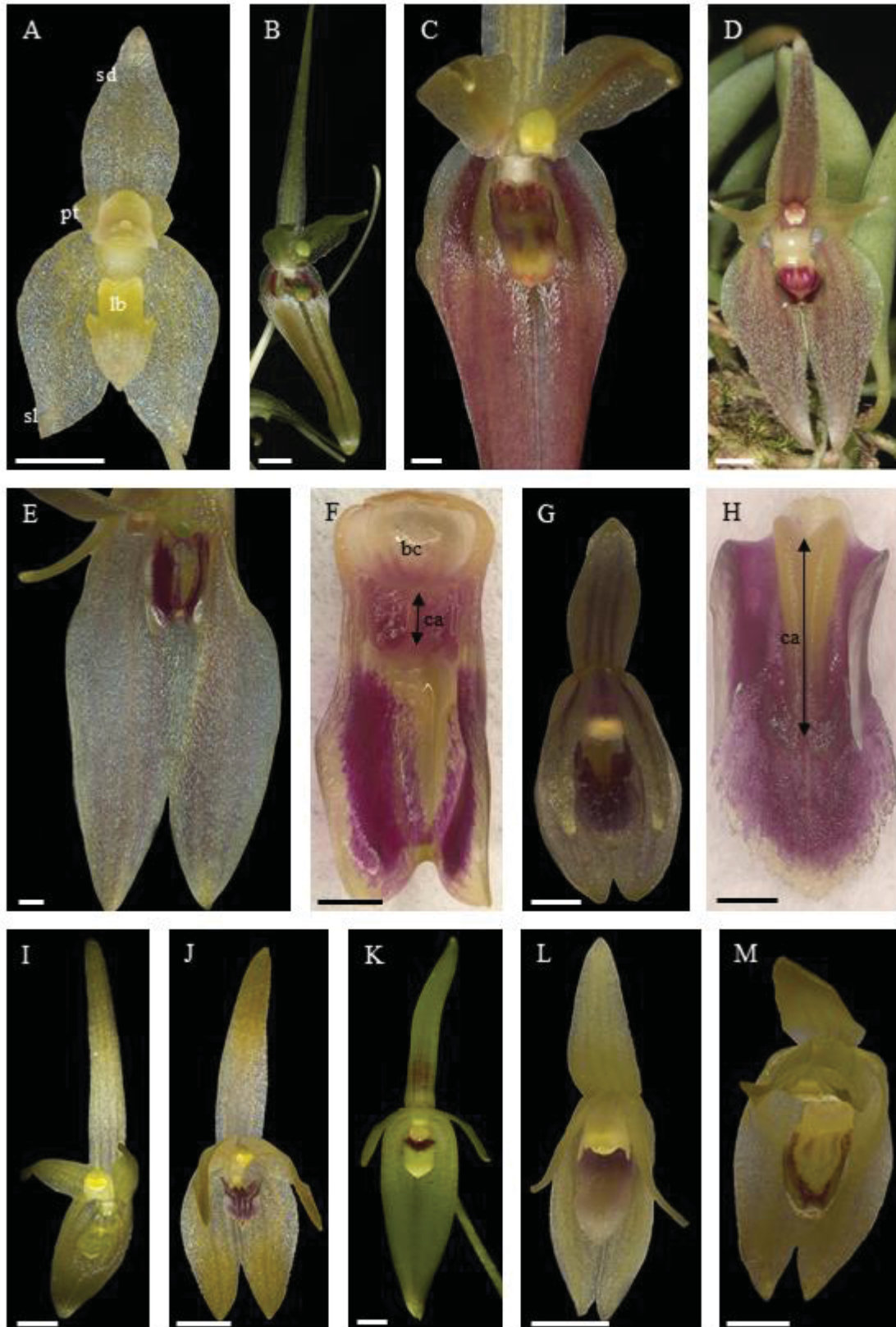


**Tabela 3.** Resultado dos testes histoquímicos em flores frescas de espécies do gênero *Barbosella*. (VN) vermelho neutro, (AC) azul de coomassie, (+) positivo, (-) sem reação, (x) teste não aplicado.

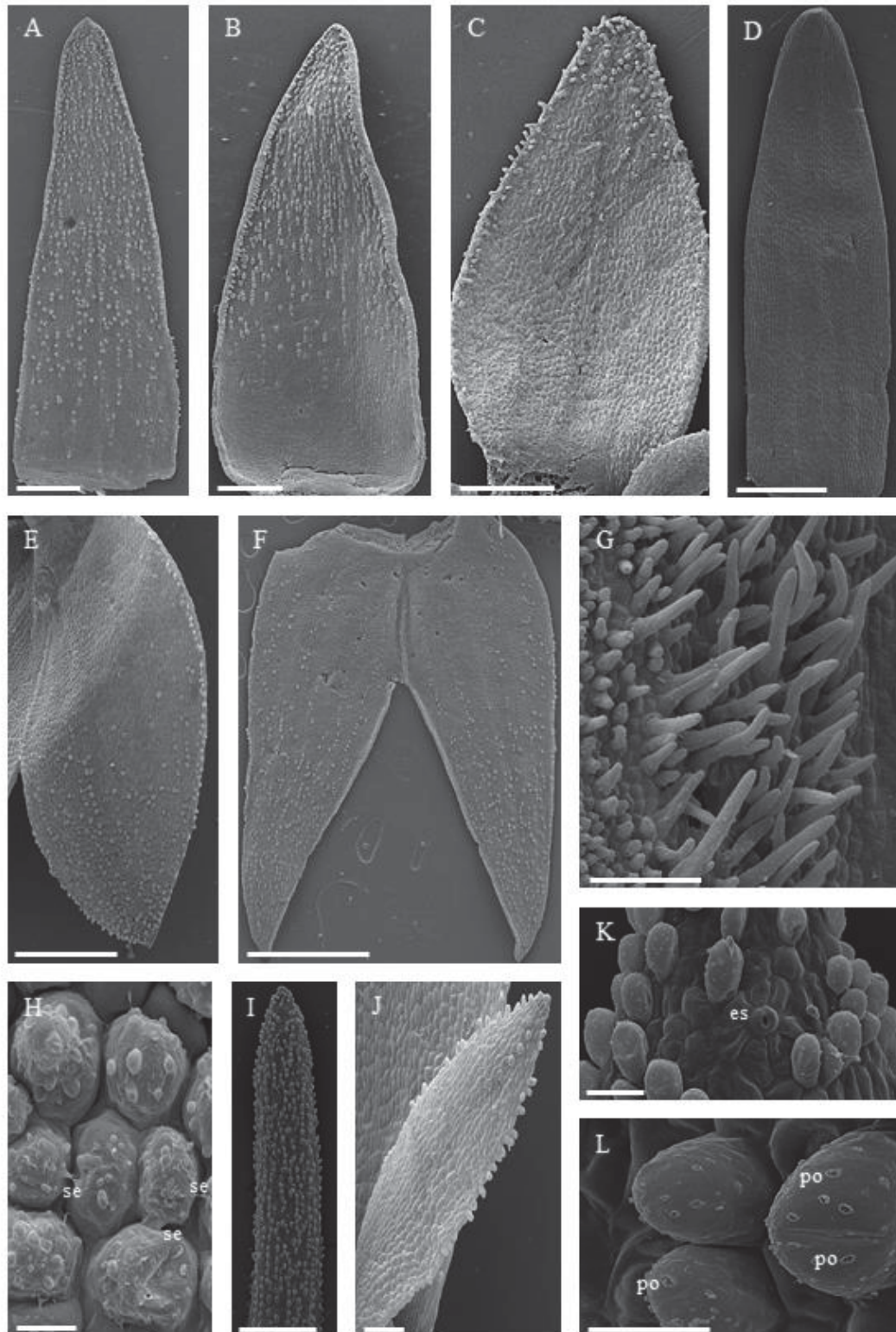
Espécies	Sépala dorsal				Sépala lateral				Pétala				Labelo			
	VN	LUGOL	AC	VN	VN	LUGOL	AC	VN	VN	LUGOL	AC	VN	VN	LUGOL	AC	AC
<i>Barbosella australis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>B. cogniauxiana</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>B. crassifolia</i>	+	-	x	+	+	-	x	+	+	-	x	+	+	+	x	x
<i>B. cucullata</i>	+	x	x	-	-	x	x	+	+	x	x	+	+	x	x	x
<i>B. dusenii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. gardneri</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-
<i>B. macartheensis</i>	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
<i>B. miersii</i>	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-
<i>B. trilobata</i>	-	-	x	+	+	-	x	-	-	-	x	+	+	-	-	x

**Tabela 4.** Resultados dos testes histoquímicos aplicados nas secções das espécies do género *Barbosella*. (AC) azul de coomassie, (PAS) Ácido Periódico - Reagente de Schiff (+) positivo, (-) sem reação.

Espécies	Sépala dorsal			Sépala lateral			Pétalas			Labelo		
	LUGOL	PAS	AC	LUGOL	PAS	AC	LUGOL	PAS	AC	LUGOL	PAS	AC
<i>Barbosella australis</i>	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+
<i>B. cogniauxiana</i>	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
<i>B. crassifolia</i>	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
<i>B. cucullata</i>	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-
<i>B. dusenii</i>	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
<i>B. gardneri</i>	-	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
<i>B. macaheensis</i>	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
<i>B. miersii</i>	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>B. trilobata</i>	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+

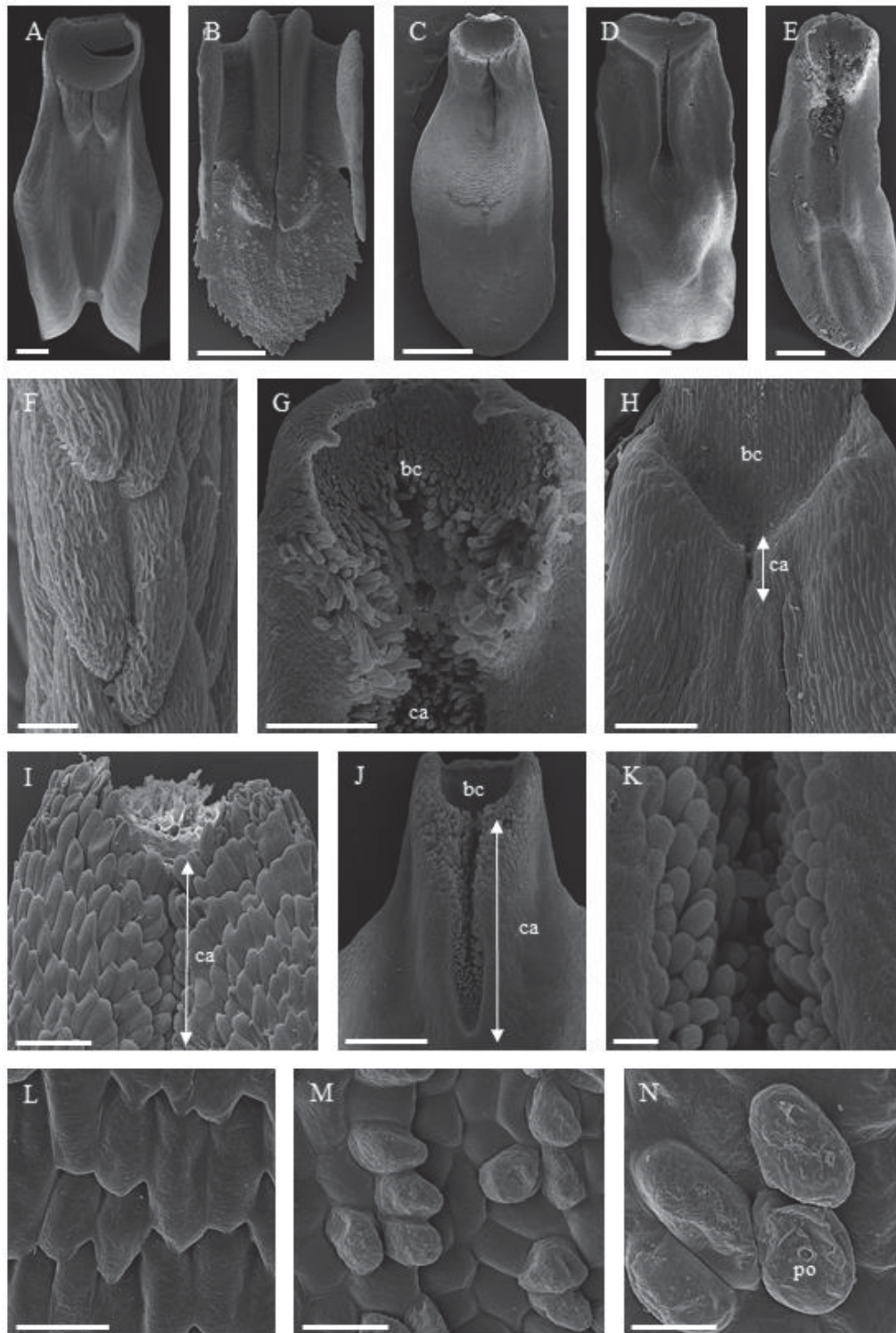


**Figura 1.** Flores do gênero *Barbosella*. (A) *B. miersii*. (B) *B. cucullata*. (C) Detalhe de (B) mostrando sépalas laterais, pétalas e labelo. (D) *Barbosella australis*. (E) Detalhe de (D) mostrando labelo e sépalas laterais. (F) Labelo de *B. australis* mostrando canal e base côncava. (G) *B. trilobata*. (H) Labelo de *B. trilobata* mostrando o canal. (I) *B. duseii*. (J) *B. gardneri*. (K) *B. cogniauxiana*. (L) *B. crassifolia* (M) *B. macaheensis*. (sd) sépala dorsal, (sl) sépala lateral, (pt) pétala, (lb) labelo. Escala: A: 0,5mm, B-D, K: 1cm; E-J, L-M: 1mm.

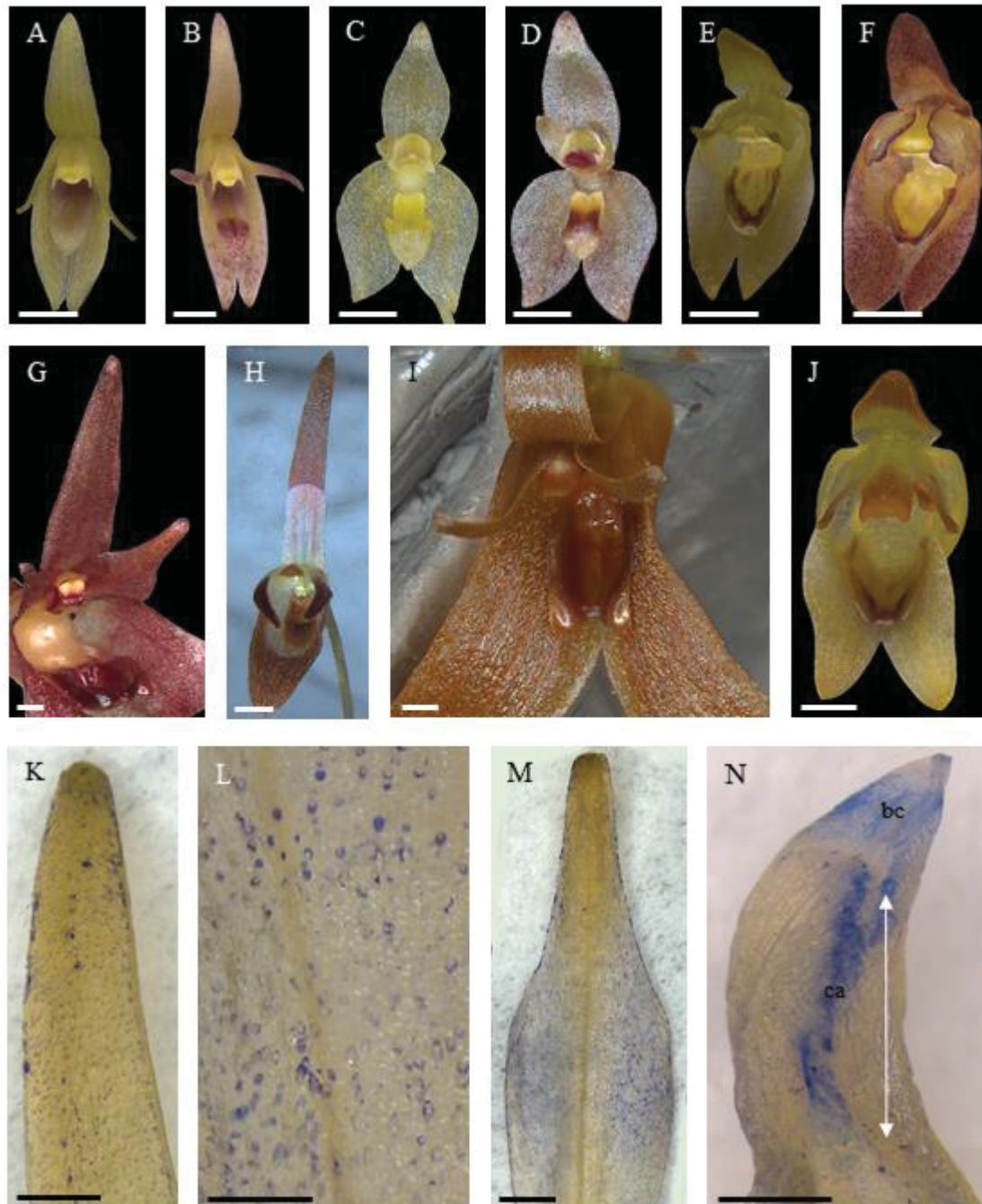


**Figura 2.** Micromorfologia das sépalas e pétalas das espécies de *Barbosella*. (A-D) Distribuição das papilas nas sépalas dorsais. (A) Papilas ao longo da peça em *B. dusenii*. (C) Papilas no ápice e porção mediana em *B. macaheensis*. (D) Papilas no ápice e margem em *B. miersii*. (D) Ápice sem papilas em *B. crassifolia*. (E-F) Distribuição das papilas nas sépalas laterais. (E) Ápice e margem em *B. miersii*. (F) Ao longo da sépala em *B. gardneri*. (G) Tricomas em *B. cucullata*. (H) Secreção e acúmulo de material entre as papilas de *B. cucullata*. (I-J) Distribuição das papilas nas pétalas. (H) Ápice e porção mediana em *B. cogniauxiana*. (I) Ápice e margem em *B. miersii*. (J) Estomas e papilas em *B. cogniauxiana*. (K) Poros na superfície das papilas da sépala dorsal de *B. cogniauxiana*. (po) poro, (se) secreção, (es) estômatos. Escalas: A-C: 0,5mm; D: 0,25mm; E: 500 µm; F: 1 mm; G: 200µm H: 20µm; I: 500µm; J: 100µm; K-L: 50µm.



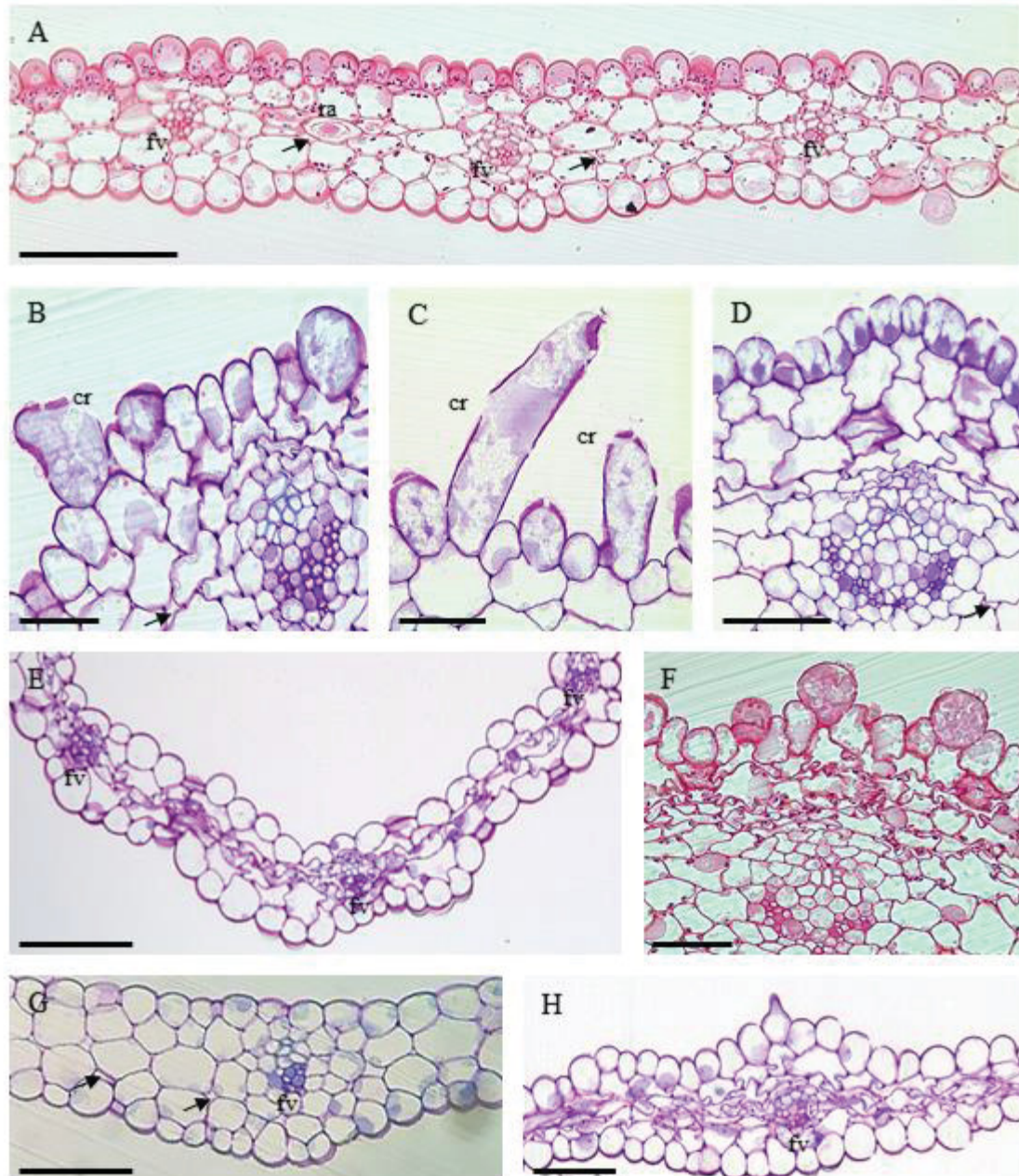


**Figura 3.** Micromorfologia dos labelos das espécies de *Barbosella* (A-B) Labelos trilobados. (A) *B. australis*. (B) *B. trilobata*. (C-E) Labelos inteiros. (C) *B. cogniauxiana*. (D) *B. cucullata*. (E) *B. dusenii*. (F) Lobos do labelo trilobato com cutícula estriada. (G) Base côncava e canal de *B. dusenii*. (H) Base côncava e canal de *B. crassifolia* sem papilas ou tricomas. (I) Base e canal de *B. miersii* formado por papilas imbricadas. Observe a ausência da base côncava. (J) Porção proximal do labelo de *B. gardnerii*, mostrando canal e base côncava. (K) Canal com tricomas em *B. gardnerii*. (L) Ápice do labelo com papilas imbricadas em *B. cogniauxiana*. (M) Ápice do labelo de *B. crassifolia* com papilas intercaladas com outras células epidérmicas comuns. (N) Poros na superfície das papilas no ápice do labelo em *B. trilobata*. (bc) base côncava, (ca) canal, (po) poro. Escalas: A, D: 1 mm; B-C, E, G: 500  $\mu$ m; F: 10  $\mu$ m; H-I: 100 $\mu$ m; J-K: 200  $\mu$ m; L: 20 $\mu$ m; M-N: 25 $\mu$ m.



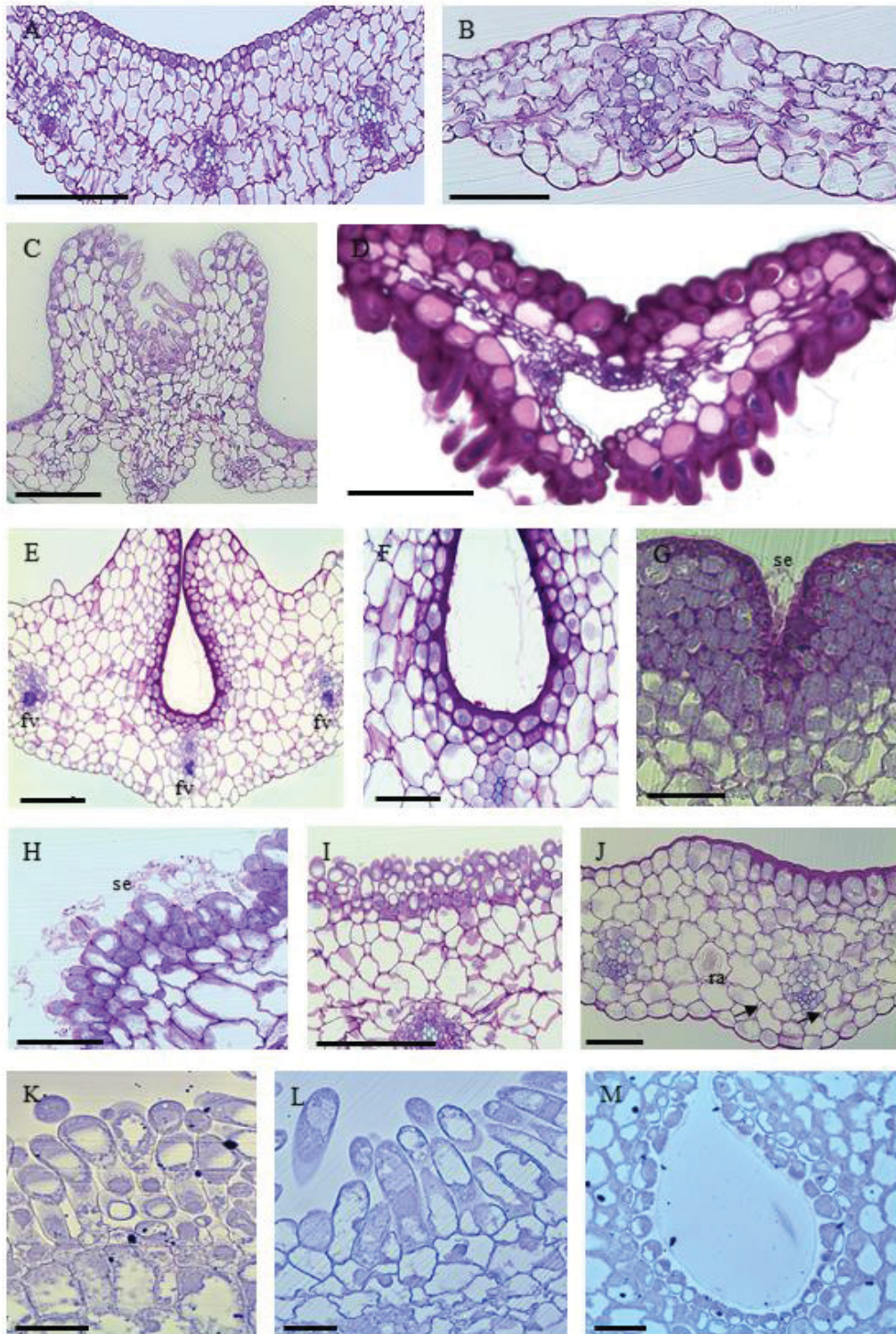
**Figura 4.** Testes histoquímicos realizados nas flores frescas das espécies de *Barbosella*. (A, C, E) Controle. (B, D, F, G) Vermelho neutro. (A-B) *B. crassifolia*. (C-D) *B. miersii*. (E-F) *B. macaheensis*. (G) Sépala dorsal e pétala de *B. austalis*. (H-J) Lugol. As regiões manchadas de marrom indicam a presença de amido. (H) *B. dusenii*. (I) *B. austalis*. (J) *B. macaheensis*. (K-N) Azul de Coomassie. As regiões manchadas de azul indicam proteína. (K) sépala dorsal de *B. austalis*. (L) Papilas com proteínas na sépala lateral de *B. austalis*. (M) Labelo de *B. dusenii*. (bc) base côncava, (ca) canal. Escalas: A-J, L: 1 mm, K-M: 0,5 mm, N: 0,25 mm.





**Figura 5.** Testes histoquímicos realizados em flores frescas das espécies de *Barbosella*. (A) Sépala dorsal de *B. crassifolia* com teste de PAS. Observe polissacarídeos insolúveis (grãos corados em roxo) presentes em todos os tecidos. (B-D) Sépala lateral de *B. cucullata*. (B) Papilas e tricomas com vacúolos. (C) Papilas na porção mediana. (E) Região mediana da sépala lateral de *B. dusenii* sem células secretoras. (F) Ápice da pétala de *B. cucullata* com teste PAS. Observe polissacarídeos insolúveis (grão corados em roxo) dispersos no parênquima. (G) Ápice da pétala de *B. crassifolia* sem células secretoras. (H) Porção mediana da pétala em *B. dusenii*. (cr) cutículas com rupturas, (fv) feixes vasculares, (ra) raphides, (setas) espaços intercelulares. Escalas: A-B, G-H: 100µm; C-D, F: 50µm; E: 200µm.





**Figura 6.** Anatomia dos labelos das espécies de *Barbosella*. (A) Ápice de *B. cogniauxiana* com epiderme secretora. (B) Ápice de *B. macaheensis* sem epiderme secretora. (C) Canal do labelo de *B. gardnerii* com tricomas secretores. (D) Porção mediana do labelo de *B. miersii* com células secretoras. (E) Canal de *B. trilobata* com células epidérmicas secretoras. (F) Detalhe do canal em (E) com epiderme e uma camada subepidérmica secretora. (G) Canal de *B. crassifolia* com secreção. (H) Secreção no canal de *B. australis*. (I) Base côncava com tricomas em *B. australis*. (J) Células secretoras do canal restritas à porção mediada do labelo em *B. crassifolia*. (K-M) Secções coradas com azul de Coomassie. (K) Proteínas nos tricomas do canal em *B. australis*. (L) Proteínas nos tricomas do canal em *B. dusenii*. (M) Proteínas na epiderme e células do parênquima do canal em *B. trilobata*. (fv) feixes vasculares, (ra) rafides, (se) secreções, (setas) espaços intercelulares. Escala: A: 200µm, B-E, J-M: 50µm; F- I: 100µm.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

As espécies analisadas possuem características compatíveis com a miofilia, como em outras espécies dentro da subtribo Pleurothallidinae. As células secretoras presentes nas sépalas e pétalas são osmóforos, e em algumas espécies há liberação de pequenas quantidades de proteínas nessas peças florais. Os labelos podem apresentar osmóforos e os canais são compostos de células secretoras. Sendo assim, concluímos que as espécies apresentam um sistema enganoso que envolve cor, ornamentação do labelo, liberação de odores e as pequenas quantidades de proteínas oferecidas que incentivam a visita e permanência dos polinizadores nas flores, aumentando as chances de sucesso reprodutivo.